

**ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ И СООБЩЕНИЙ, ПРЕДСТАВЛЕННЫХ НА  
ВСЕРОССИЙСКИЙ СИМПОЗИУМ ПО БИОЛОГИИ КЛЕТКИ В КУЛЬТУРЕ  
«КУЛЬТИВИРУЕМЫЕ КЛЕТКИ КАК ОСНОВА КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ»**

**(Санкт-Петербург, 12—14 октября 2009 г.)**

**ИСТОЧНИКИ ОБРАЗОВАНИЯ ЭНДОКРИННЫХ КЛЕТОК В ОРГАНИЧЕСКИХ КУЛЬТУРАХ ЭМБРИОНАЛЬНОЙ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ.** © *Е. Я. Адоева*. Российская Военно-медицинская академия, Санкт-Петербург, [adoeva@mail.ru](mailto:adoeva@mail.ru).

В медико-биологических и клинических исследованиях широко используют клеточные и органые культуры поджелудочной железы. Особый интерес представляет изучение возможных источников образования эндокринных клеток в процессе культивирования. В качестве объектов исследования в работе были использованы органые культуры эмбриональной поджелудочной железы крысы. В стерильных условиях извлекали поджелудочную железу, промывали в растворе Хэнкса с антибиотиками (по 300 ЕД/мл пенициллина и 300 мкг/мл стрептомицина) и разрезали на кусочки с размером сторон 1—2 мм. Культивирование проводили по методу множественных органых культур (Лурия, 1972).

В результате проведенных нами исследований было установлено, что в процессе культивирования в эксплантатах функционально активными во все сроки культивирования остаются В-клетки, скопления которых обнаруживаются вблизи эпителиальных трубок. Цитоплазма В-клеток характеризуется хорошо развитой шероховатой эндоплазматической сетью. Она образована короткими канальцами и небольшими вакуолями, на мембранах которых находятся связанные рибосомы. Элементы эндоплазматической сети рассеяны равномерно по всей цитоплазме. Имеется также значительное число свободных рибосом, расположенных поодиночке или в виде полисом. В клетках выявляются многочисленные секреторные гранулы различной степени зрелости. Отмечается гипертрофия комплекса Гольджи, представленного большим числом цистерн, крупных и мелких вакуолей, в которых происходят интенсивное формирование и созревание гранул секрета. В некоторых В-клетках встречаются митозы. На периферии эксплантатов отмечается интенсивное разрастание эндокринной паренхимы. Наблюдается слияние отдельных островков в большие массы эндокринной ткани. В цитоплазме В-клеток выявляются многочисленные секреторные гранулы на разных стадиях формирования секрета. Тесный контакт гранул с плазмалеммой и наличие в цитоплазме пустых вакуолей являются доказательством активного выведения секрета. Встречаются также клетки, одновременно содержащие в цитоплазме

гранулы зимогена и эндокринные секреторные гранулы, что указывает на процесс ацино-инсулярной трансформации. Появление эндокринных клеток отмечается в составе эпителиальных трубок и выводных протоков, эпителий которых можно рассматривать как источник образования инсулоцитов. Встречаются ацино-инсулярные клетки. Можно предположить, что ацино-инсулярная трансформация является одним из источников образования инсулоцитов при различных состояниях, сопровождающихся повышенной функциональной нагрузкой на эндокринный аппарат поджелудочной железы. В процессе органного культивирования инсулоциты сохраняют способность к делению.

**ВЛИЯНИЕ ГИПЕРГЛИКЕМИИ НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЖИРОВОЙ ТКАНИ.** © *Ж. А. Акопян, Т. Н. Кочегура, Г. А. Шаронов, Н. И. Калинина, Е. В. Парфенова*. Факультет фундаментальной медицины Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова.

Ранее в нашей лаборатории было обнаружено, что трансплантация аутологичных стромальных клеток жировой ткани является перспективным подходом для стимуляции ангиогенеза в ишемизированных тканях. Известно, что хроническая гипергликемия вызывает нарушение функциональной активности клеток кровеносных сосудов, а также предшественников эндотелиальных клеток, обуславливая тем самым патологический рост кровеносных сосудов при сахарном диабете. Однако влияние гипергликемии на функциональную активность стромальных клеток жировой ткани до сих пор не изучено. В нашей работе мы проанализировали влияние гипергликемии на жизнеспособность и пролиферативную активность стромальных клеток жировой ткани, а также на экспрессию ангиогенных факторов роста этими клетками. С помощью проточной цитометрии было установлено, что длительное культивирование стромальных клеток жировой ткани в условиях гипергликемии не влияет на количество мезенхимных предшественников и перидитов в популяции этих клеток, а также на их пролиферативную активность, жизнеспособность и апоптоз. Однако при анализе экспрессии ангиогенных факторов роста с помощью чипов-микрочипов для ПЦР в реальном времени было установлено, что культивирование стромальных

клеток в условиях гипергликемии вызывает в них изменение экспрессии ряда генов, кодирующих регуляторы роста кровеносных сосудов. Полученные нами данные позволяют предположить, что длительное воздействие гипергликемии вызывает снижение ангиогенной активности посредством влияния на экспрессию факторов, регулирующих рост кровеносных сосудов.

**СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА КУЛЬТИВИРОВАНИЯ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА КРЫСЫ НА КОЛЛАГЕНЕ I ТИПА, ПОЛУЧЕННОМ РАЗНЫМИ МЕТОДАМИ.** © А. А. Бармашева,<sup>1</sup> И. А. Шарутина,<sup>2</sup> Н. С. Николаенко,<sup>3</sup> Л. В. Кухарева,<sup>3</sup> И. И. Шамолина,<sup>2</sup> Г. П. Пинаев.<sup>3</sup> <sup>1</sup> С.-Петербургский медицинский университет им. акад. И. П. Павлова, <sup>2</sup> С.-Петербургский университет технологии и дизайна и <sup>3</sup> Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Коллаген является фибриллярным белком, одним из гликопротеинов межклеточного матрикса. Коллаген I типа широко применяется в медицине и биотехнологии благодаря относительной простоте получения, низкой иммуногенности, способности к биodeградации, гемостатическим свойствам и возможности использования в качестве носителя клеток. Влияние организации коллагеновой подложки на стромальные клетки костного мозга (СККМ) не исследовалось. Поэтому целью данной работы стало исследование пролиферации, распада и остеогенной дифференцировки СККМ крысы на различных фибриллярных коллагеновых субстратах, а для желирующих коллагенов и при трехмерном культивировании в гелях.

Ядросодержащие клетки костного мозга беспородных крыс получали центрифугированием на градиенте гистопакта плотности 1.077 г/мл и культивировали в ростовой среде, состоящей из  $\alpha$ MEM с добавлением 10 % сыворотки эмбрионов коров и смеси пенициллина и стрептомицина в стандартной концентрации. Клетки пассировали с помощью смеси 0.25%-ного раствора трипсина и 0.02%-ного раствора ЭДТА в физиологическом буфере. Препараты коллагена были получены из шкуры овцы или молодого быка методом щелочно-солевой экстракции. Контрольный стандартный коллаген был получен с помощью кислотной экстракции из хвостов крыс. Для получения фибриллярной формы коллагена использовали метод Ю. Швед и Л. В. Кухаревой. Актиновый цитоскелет распластанных клеток окрашивали с помощью родамин-фаллоидина. Использовали конфокальный микроскоп Leica TCS SL (ФРГ). Измерения площади и периметра распластанных и окрашенных родамин-фаллоидином клеток проводили на микроскопе AxioPhot при помощи компьютерной программы ВидеоТест-Размер 5.0. Определяли индекс пролиферации СККМ второго пассажа в логарифмической фазе роста клеток через 4 сут культивирования. Коллагеновый гель (2.5 мг/мл) получали из концентрированного раствора коллагена I типа путем разведения исходного раствора коллагена до нужной концентрации 10 $\times$ -средой 199 с подведением pH с помощью щелочи. Клеточную взвесь вводили в раствор коллагена, затем поверх геля добавляли 1 мл ростовой среды. Для индукции остеогенной дифференцировки СККМ использовали дифференцировочную среду, содержащую ростовую среду,  $\beta$ -глицерофосфат натрия, дексаметазон и аскорбат натрия. Локализацию маркера остеогенной диффе-

ренцировки — щелочной фосфатазы — выявляли гистохимически с помощью смеси BCIP/NBT.

В работе было показано, что наибольшая площадь распада была у СККМ на контрольном фибриллярном коллагене I типа (из хвостов крыс), а также на одном из фибриллярных коллагенов I типа из шкуры овцы. При культивировании клеток на этих препаратах наблюдались наибольшая пролиферативная активность и остеогенная дифференцировка СККМ. Оба коллагена давали устойчивые гели, в которых клетки культивировали до 2 нед и индуцировали их остеогенную дифференцировку.

Таким образом, наибольшее распада СККМ и максимальный индекс их пролиферации наблюдались на образцах контрольного коллагена из хвостов крыс и гелеобразующего коллагена из шкуры овцы. Эти же образцы оказались наиболее приемлемыми для проведения остеогенной дифференцировки стромальных клеток и их трехмерного культивирования в геле *in vitro*. Гелеобразующий образец коллагена I типа, полученного из шкуры овцы с помощью щелочно-солевой экстракции, можно рекомендовать для применения в заместительной клеточной терапии в качестве носителя стромальных стволовых клеток.

**КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ПОТОМКОВ СТРОМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КРЫСЫ НА ХИТОЗАНОВЫХ МАТРИЦАХ С ЦЕЛЛЮЛОЗНЫМИ И КЕРАТИНОВЫМИ ВОЛОКНАМИ.** © Д. И. Билько, Н. В. Шанявская. Национальный университет «Киево-Могилянская академия», Киев, nbilko@ukma.kiev.ua.

Стромальные стволовые клетки являются могучим источником адгезивно-зависимых клеток, которые находят все большее применение в заместительной терапии и регенераторной медицине. В настоящее время с целью накопления клеточной биомассы *ex vivo* используются двухмерные культуры, которые не удовлетворяют потребности в количественном увеличении культивированных клеток, поскольку поверхность пластика имеет ограниченную площадь и при достижении клетками сплошного монослоя рост клеток подавляется. Современные разработки в сфере биотехнологии и клеточной терапии требуют поисков новых методов культивирования клеток.

Использование биологически совместимых матриц на основе хитозана, модифицированного волокнами целлюлозы и кератина, имеющих трехмерную структуру, позволяет в несколько раз увеличить площадь культивирования адгезивно-зависимых клеток и обеспечивает высокую степень диффузии питательных веществ. Кроме того, с точки зрения клинической практики трансплантация или перенос культивированных клеток вместе со сформированной матрицей является технически более оправданным и целесообразным, чем перенос и трансплантация клеточных суспензий.

Культуру стромальных клеток костного мозга крыс получали путем извлечения их из бедренной кости крысы Вистар и культивирования на хитозановых матрицах, модифицированных волокнами целлюлозы и кератина, которые стерилизовали автоклавированием. Матрицы формировали путем сшивания хитозана глутар-альдегидом, после полимеризации высушивали и многократно отмывали от остатков неполимеризовавшихся реагентов.

Проведенные исследования показали, что в результате культивирования клеток на целлюлозных и кератиновых волокнах в течение 2-недельного срока в полной питательной среде образуется монослой фибробластоподобных клеток, которые характеризуются высокой степенью адгезии и повышенной пролиферативной активностью по сравнению с клетками, культивированными на поверхности культурального пластика. Различия статистически достоверны ( $p < 0.05$ ).

Таким образом, использование трехмерных матриц на основе хитозана с добавлением волокон целлюлозы и кератина для культивирования адгезивно-зависимых клеток является адекватным методом для повышения биомассы культивированных клеток *in vitro* и открывает перспективы их дальнейшего изучения и последующего использования в качестве трансплантатов.

**ВЛИЯНИЕ ФАКТОРА РОСТА FL3 НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ КЛЕТОК AC133+ КОРДОВОЙ КРОВИ.** © Н. М. Билько, С. В. Васильевская, Д. И. Билько. Национальный университет «Киево-Могилянская академия», Киев, nbilko@ukma.kiev.ua.

Ближайшими потомками полипотентных гемопоэтических стволовых клеток принято считать клетки, позитивные по маркеру AC133+. Они являются перспективной моделью для экспансии ранних клеток-предшественников гемопоэза. Выделение AC133+-клеток из кордовой крови осуществляли методом позитивной магнитной селекции (Miltenyi Biotech, Германия), разводили в 1 мл среды (DMEM + 15 % FCS) и инкубировали на протяжении 12, 16 и 18 ч с фактором роста Flt-3L в концентрации 10 нг/мл (Sigma, США) при стандартных условиях. Затем добавляли комплекс цитокинов в концентрациях 10 нг/мл IL-3 и 10 нг/мл GM-CSF (Sigma, США) и культивировали в течение 5 нед. Ежедневно проводили исследование клоногенной активности клеток в полужидком агаре и сравнивали полученные значения с таковыми для исходной фракции AC133+-клеток. Прошедшие инкубацию клетки переносили в гелевые диффузионные камеры, имеющие патентную защиту, и культивировали в присутствии цитокинов. Продление срока инкубации с Flt3 до 16 ч позволило значительно повысить клоногенную активность клеток фракции AC133+. Сумма колониеобразующих единиц увеличивалась до  $212.50 \pm 24.95$ , что приблизительно в 3.2 раза превышает данный показатель при инкубации в течение 12 ч ( $66.69 \pm 19.07$ ;  $P < 0.001$ ) и приблизительно в 6.8 раза выше данных контроля ( $31.40 \pm 8.18$ ;  $P < 0.001$ ). 18-часовая инкубация не приводила к увеличению клоногенной активности клеток ( $180.43 \pm 15.82$ ) по отношению к данным значениям после 16 ч, хотя данный показатель значительно превышал таковой при 12-часовой инкубации ( $66.69 \pm 19.07$ ;  $P < 0.001$ ) и в контроле ( $31.4 \pm 8.18$ ;  $P < 0.001$ ). Результаты клоногенного анализа AC133+-клеток, выделенных из кордовой крови, свидетельствуют о том, что стимулирующий эффект фактора роста Flt3 определяется на протяжении 12–18 ч, однако его действие наиболее выражено после 16-часовой инкубации. Рецептор Flt3, или CD135, принадлежит к классу рецепторов факторов роста, вовлеченных в ранний гемопоэз. Он относится к семейству клеточных белков, которые совмещают в себе функции рецептора и внутриклеточной тирозинкиназы и способствует пролиферации

и дифференцировке ранних клеток-предшественников гемопоэза. Однако только в синергизме с другими гемопоэтическими факторами, например IL-3 и GM-CSF, он способствовал росту клоногенных миелоидных клеток-предшественников. Рост показателей клоногенной активности в культуре свидетельствовал о включении в пролиферацию и дифференцировку ранних клеток-предшественников фракции AC133+-клеток, находящихся в фазе покоя в исходном состоянии. Исходя из вышесказанного Flt3 в первую очередь способствует продвижению ранней популяции клеток-предшественников на последующие этапы развития, в процессе которого повышается чувствительность клеток к цитокинам и наблюдается накопление функционально активных потомков стволовой клетки в результате достигается высокий уровень показателей колониеобразования в культуре *in vitro*. Таким образом, в процессе культивирования AC133+-клеток в диффузионных камерах, помещенных в культуральную систему, содержащую комплекс рекомбинантных цитокинов, с предварительной инкубацией с фактором Flt3 происходит длительное поддержание пролиферативной активности гемопоэтических клеток, что отражается в их постоянной экспансии на протяжении 5 нед, а также сохранении высоких показателей функциональной активности.

**ВЛИЯНИЕ ПОВРЕЖДЕННОЙ ТКАНИ МОРСКОЙ ЗВЕЗДЫ ASTERIAS RUBENS НА ПОВЕДЕНИЕ ЦЕЛОМОЦИТОВ В УСЛОВИЯХ IN VITRO.** © М. И. Блинова, Д. Е. Бобков, А. Н. Горшков, Г. П. Пинаев. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, mira.blinova@mail.ru.

Морские беспозвоночные представляют собой уникальную природную модель для изучения фундаментальных процессов регенерации. Одним из предполагаемых клеточных источников процессов заживления ран и регенерации у этих видов рассматриваются целомоциты. Они первыми реагируют на любое повреждение почти моментальной коагуляцией их и образованием сгустка, закрывающего рану.

Во время экспедиций на Беломорскую биологическую станцию «Картеш» (Зоологический институт РАН) была отработана *in vitro* модель образования сгустка целомоцитов. Образование такого сгустка в условиях *in vitro* выражалось в виде формирования сети целомоцитов и ее сокращения при определенных условиях. Активно этот процесс протекал лишь при участии целомоцитов пораненной звезды. Экспериментальная рана выполнялась путем небольшого надреза с помощью скальпеля на одном из лучей. Было установлено, что через 10 мин после этой операции рана полностью закрывалась и никакого вытекания целомиической жидкости больше не происходило. Но через 5 ч после нанесения раны количество целомоцитов в целомиической жидкости звезды значительно увеличивалось. Кроме того, у звезд с такими повреждениями выделяли фрагменты целомиического эпителия и культивировали их в течение 10–12 сут. Из фрагментов в процессе культивирования происходила активная миграция клеток и наблюдалось образование многоклеточных структур.

У пораненных звезд через 5 ч после повреждения луча выделяли целомоциты и брали фрагменты целомиического эпителия. Фрагменты эпителия помещали в культуральную среду и туда же вносили выделенные це-



ломоциты. Влияние фрагментов ткани на функциональную активность целомицитов оценивали по степени формирования ими сети и времени ее сокращения.

Было показано следующее. 1. В присутствии фрагмента целомического эпителия стандартно образуется сеть целомицитов после добавления раствора  $\text{Ca}^{2+}$ , движение ее при сокращении направлено в сторону фрагмента, тогда как в контроле (в отсутствие фрагмента) сеть сокращается к центру лунки с образованием сгустка. 2. В присутствии нескольких фрагментов, распределенных в разных местах лунки, или сплошного кольца эпителия, расположенного по периферии лунки, образовавшаяся сеть не могла сократиться до конца и оставалась между фрагментами или в просвете кольца фрагментов эпителия в прикрепленном к ним состоянии. 3. При сокращении сети целомицитов слабо прикрепленные к стенке лунки фрагменты ткани могли вместе с сетью при сокращении ее перемещаться к месту образования сгустка. 4. Формирование и сокращение сети в присутствии фрагментов ускоряются по сравнению с контролем. 5. В присутствии суспензии клеток эпителия, мигрировавших из культивируемых фрагментов, наблюдались также ускоренное образование и сокращение сети целомицитов по сравнению с контролем. 6. Супернатант раствора, в котором находились клетки, мигрировавшие из культивируемых фрагментов эпителия, оказывал стимулирующее влияние на образование и сокращение сети целомицитов по сравнению с контролем, хотя сам процесс протекал более медленно, чем в присутствии цельных фрагментов ткани. Полученные результаты могут свидетельствовать о влиянии поврежденного целомического эпителия на функционирование целомицитов.

Электронно-микроскопическое исследование популяции целомицитов и ткани целомического эпителия неповрежденной звезды дает основания полагать, что восстановление и увеличение количества целомицитов через некоторое время после повреждения могут происходить за счет клеток целомического эпителия.

**НЕАДГЕЗИВНЫЕ СУБПОПУЛЯЦИИ КЛОНОГЕННЫХ РОДОНАЧАЛЬНЫХ КЛЕТОК КРОВЕТВОРНОЙ СТРОМЫ КОСТНОГО МОЗГА КРЫСЫ И ЧЕЛОВЕКА — МОДЕЛЬ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ГЕТЕРОГЕННОГО ПУЛА ПОЛИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК (МСК) IN VITRO.** © Э. И. Бувеева, Е. А. Молчанова. Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН, Москва, bueverova\_e@mail.ru.

МСК в культуре являются неоднородной клеточной популяцией, о чем свидетельствуют гетерогенность пролиферативного статуса, их адгезивных свойств, различная степень зрелости клеток, морфологическое разнообразие и неодинаковые потенции к дифференцировке. В настоящей работе изучали способность к адгезии МСК, определяемых по содержанию колониеобразующих единиц фибробластов (КОЕ-Ф) костного мозга крысы и человека, в популяции клеток, не прикрепившихся к поверхности пластика в первичной культуре. Было установлено, что КОЕ-Ф костного мозга крысы и человека спустя 7 сут культивирования *in vitro* остаются в суспензии не прикрепившихся к пластику клеток, обладая высококлоногенной способностью. При более длительных сроках культивирования эта неадгезивная популяция дала начало последующим неадгезивным субпопуляциям при еженедельном пе-

реносе клеточной суспензии в новые культуральные флаконы. В неадгезивных субпопуляциях костного мозга крысы наблюдали истощение пула КОЕ-Ф к 42-м сут культивирования (6 неадгезивных субпопуляций), а КОЕ-Ф костного мозга человека сохранялись до 49 сут (6 неадгезивных субпопуляций). Обнаружено, что особенностью КОЕ-Ф неадгезивных субпопуляций костного мозга крысы и человека является сокращение времени формирования колоний фибробластоподобных клеток до 7 сут (т. е. они образуются в 1.5—2.0 раза быстрее, чем в первичной культуре). Возможность постепенного и поэтапного истощения пула родоначальных стромальных клеток адгезией к пластику в данных условиях культивирования МСК костного мозга крысы и человека может стать основой экспериментального анализа иерархических отношений внутри популяции МСК *in vitro*. Показано, что МСК костного мозга крысы из четырех неадгезивных субпопуляций не отличались по исследованным фенотипическим маркерам — CD90 и CD73 — от контрольной адгезивной популяции в первичной культуре, а также демонстрировали одинаковую способность к остеогенной и адипогенной дифференцировке в стандартных индукционных средах, что характеризует их соответствие основным критериям МСК. Суммарное число колоний, образованных КОЕ-Ф костного мозга из всех неадгезивных клеточных субпопуляций, примерно в 6 раз превосходило таковое адгезивной популяции в первичной культуре. В связи с тем что костный мозг является предпочтительным источником МСК, использование неадгезивных клеточных субпопуляций костного мозга человека, способных дать значительное число дискретных колоний, содержащих клетки с высоким пролиферативным потенциалом, позволяет существенно повысить количество МСК в представленной нами культуральной системе.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 09-04-00002) и гранта президента РФ «Ведущие научные школы» (НШ-1134.2008.4).

**МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БИОРЕЗОРБИРУЕМЫХ НОСИТЕЛЕЙ ДЛЯ ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ, ПОЛУЧЕННЫХ МЕТОДОМ ПОВЕРХНОСТНОГО СЕЛЕКТИВНОГО ЛАЗЕРНОГО СПЕКАНИЯ.** © Т. Б. Бухарова,<sup>1,3</sup> В. К. Попов,<sup>2</sup> Е. Н. Антонов,<sup>2</sup> Т. Х. Фатхудинов,<sup>1,4</sup> А. В. Попова,<sup>2</sup> А. В. Волков,<sup>1,4</sup> С. А. Бочкова,<sup>2</sup> В. Н. Баграташвили,<sup>2</sup> Д. В. Гольдштейн.<sup>1,3</sup> <sup>1</sup> ЗАО «РеМетэкс», Москва, <sup>2</sup> ИПЛИТ РАН, Троицк, <sup>3</sup> ГУ МГНЦ РАМН и <sup>4</sup> ГУ НИИ МЧ РАМН, Москва.

Одним из наиболее перспективных направлений современной тканевой инженерии является разработка тканеинженерных конструкций (ТИК) на основе трехмерных биорезорбируемых матриц-носителей и мультипотентных стромальных клеток (МСК). Изготовление носителей ТИК путем быстрого лазерного прототипирования (послойного изготовления трехмерных структур) позволяет в широких пределах варьировать структурой и пористостью носителя. Применение в качестве клеточного компонента конструкции МСК приводит к индукции регенерации ткани за счет выделения факторов роста и дифференцировки, к стимуляции синтеза межклеточного вещества и, возможно, к замещению утраченных клеток, что значительно ускоряет восстановление поврежденной

ткани. Иммобилизация культивированных клеток на матрице-носителе обеспечивает максимально высокую концентрацию клеток в области повреждения, повышает выживаемость клеток при трансплантации и определяет гистотипическую дифференцировку.

Данное исследование направлено на изучение биосовместимости носителей, полученных из полимолочной кислоты методом поверхностно-селективного лазерного спекания, и разработку ТИК на их основе с применением МСК костного мозга.

### Материал и методика

Носители изготавливали методом поверхностно-селективного лазерного спекания (ПСЛС) из порошков полимолочной кислоты (Poly(D,L)-lactic acid,  $M_w = 83$  кДа, Alkermes, США) с размером частиц  $\sim 200$  мкм на установке селективного лазерного спекания СЛС-100 (ИПЛИТ РАН, Шатура). Длина волны лазерного излучения  $\lambda = 1.06$  мкм, мощность до 10 Вт. Цитотоксичность образцов носителей определяли с помощью МТТ-теста. Прикрепление, распластывание и плотность расположения МСК костного мозга на поверхности носителя оценивали с применением сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). Скорость резорбции и характер регенерации при трансплантации ТИК изучали при подкожном введении конструкции в область спины крысы.

### Результаты

Данные МТТ-теста свидетельствуют об отсутствии цитотоксического эффекта носителей. С помощью СЭМ показана эффективная клеточная адгезия МСК на поверхности носителей: клетки хорошо распластаны, имеют характерную веретеновидную форму. После 3 сут культивирования МСК на поверхности носителей выявляются отдельные прикрепленные клетки, на 7-е сут клетки располагаются группами, их количество значительно увеличивается, местами выявляются многослойные структуры.

ТИК представляет собой пористый полилактидный носитель цилиндрической формы с диаметром основания 12 мм и высотой 4 мм, заселенный МСК костного мозга, культивированными от 1 до 3 пассажей. На одном носителе иммобилизовано от 200 до 300 тыс. клеток. Клетки инкубировали на носителе в течение 7 сут. Витальность клеток составляет не менее 85 %. С помощью иммунофенотипического анализа определяются экспрессия стромальных маркеров CD90 и CD105 у 60—90 % клеток и отсутствие экспрессии CD34.

На 90-е сут после трансплантации ТИК крысам по периферии трансплантат окружен валиком рыхлой волокнистой соединительной ткани, которая прорастает в поры ТИК. Размер трансплантата вместе с капсулой составлял  $8 \pm 5$  мм. В окружающих тканях не было выявлено каких-либо патологических изменений, выраженной воспалительной инфильтрации, неопластических изменений и др. Общее состояние животных на протяжении всего эксперимента сохранялось удовлетворительным. Вокруг и внутри трансплантата образовалась грануляционная ткань с большим количеством кровеносных сосудов, инфильтрованная фибробластоподобными клетками-предшественниками, что является хорошей предпосылкой для органотипической регенерации.

### ИЗУЧЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ РАЗЛИЧНЫХ БИОДЕГРАДИРУЕМЫХ ПОЛИМЕРОВ ДЛЯ ИММОБИЛИЗАЦИИ КЕРАТИНОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА.

© А. В. Валаханович,<sup>1</sup> З. Б. Квачева,<sup>1</sup> С. А. Беляев,<sup>2</sup> Н. И. Гурманчук,<sup>3</sup> О. В. Петракова,<sup>3</sup> Ю. А. Кабанова,<sup>1</sup> Н. И. Мезен,<sup>3</sup> Е. Н. Романюк,<sup>1</sup> С. В. Корень.<sup>1</sup> <sup>1</sup> ГУ «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и иммунологии» Министерства здравоохранения Республики Беларусь, <sup>2</sup> Белорусский государственный университет и <sup>3</sup> Белорусский государственный медицинский университет, Минск.

Перспективным направлением для лечения ожоговых больных является применение накопленной в культуре биомассы аутологичных или аллогенных эпидермальных кератиноцитов. Трансплантация клеток может производиться различными методами и способами — созданием специальной повязки из биодеградирующего материала, обеспечивающего иммобилизацию и переживание выращенных клеток, а также матрицы-носителя (субстрата), на котором клетки могли бы адгезироваться, пролиферировать и быть перенесенными на раны, т. е. использоваться в качестве повязки. Несмотря на большое количество коммерческих клеточных продуктов и биодеградирующих материалов для иммобилизации клеток, они до сих пор являются недоступными для широкого использования в медицинской практике вследствие их высокой стоимости. Поэтому до сих пор ведутся поиск и исследование недорогих эффективных биодеградирующих субстратов для иммобилизации кератиноцитов и их трансплантации.

Цель нашего исследования — разработка и отбор субстратов в виде повязки на основе различных форм окисленной целлюлозы и геля на основе декстрана с добавками различных аминокислот для иммобилизации кератиноцитов. За критерий отбора были приняты стабильность pH среды при культивировании клеток на субстрате (pH 6.8—7.2), способность клеток сохранять жизнеспособность и функциональную активность, а также возможность биодеградации субстрата и геля.

Методы. Культуры кератиноцитов получали по методике, адаптированной и оптимизированной в нашей лаборатории. Источником клеток явились 12 биопсийных образцов кожи человека. Для отделения эпидермиса от дермы образцы обрабатывали 0.25%-ным раствором диспазы на PBS без  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$ , pH 7.2, в течение 18—20 ч при 4 °C. Затем отделяли эпидермис от дермы по линии базальной мембраны. Кусочки эпидермиса измельчали на отдельные фрагменты, трехкратно обрабатывали 0.1%-ным раствором коллагеназы и 0.25%-ным раствором трипсина (1 : 1) в течение 30 мин при 37 °C. Ферменты нейтрализовали добавлением питательной среды с 10 % FBS. Полученную взвесь клеток пропускали через стерильные фильтры с диаметром пор 200 мкм, центрифугировали при 1200 об/мин в течение 10 мин. Осадок ресуспендировали в питательной среде ДЕМ с 10 % FBS и гентамицином — 50 мкг/мл. Количество жизнеспособных клеток определяли при их окраске 0.5%-ным раствором трипанового синего. Посевная доза клеток составляла 500 тыс. в 1 мл ростовой среды. Клетки после добавления эпидермального фактора роста культивировали в пластиковых флаконах, покрытых коллагеном I типа, по ранее отработанной методике в  $\text{CO}_2$ -инкубаторе при 37 °C в течение 10—14 сут. Смену среды осуществляли через каждые 3 сут. После накопления достаточной биомассы,



клетки снимали, переводили в суспензию и иммобилизовывали на исследуемые субстраты и гель, помещали во флакон с питательной средой и инкубировали в термостате в течение 2—3 нед. В результате тестирования pH среды, жизнеспособности кератиноцитов, степени биодеградации различных форм субстратов и гелей были отобраны наиболее эффективные. Наилучшие результаты были установлены при применении кальциевой формы окисленной целлюлозы и геля на основе декстрана с добавлением аминокислот. Культивируемые клетки в данных условиях длительно сохраняли свою жизнеспособность, что свидетельствовало о хорошей их биосовместимости с субстратом и гелем и отсутствии токсичности. Отобранный нами субстрат на основе модификации окисленной целлюлозы и гель на основе модификации декстрана могут быть рекомендованы для иммобилизации клеток и создания недорогих повязок для закрытия раневых и ожоговых дефектов кожи и их восстановления.

**КУЛЬТУРА КЛЕТОК ЭНДОТЕЛИЯ КРОВЕНОСНЫХ СОСУДОВ — МОДЕЛЬНАЯ СИСТЕМА ДЛЯ ОЦЕНКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ.** © Г. Н. Величко,<sup>1</sup> А. Ф. Шуляк,<sup>1</sup> Н. Н. Склянкина,<sup>2</sup> О. Н. Щегловитова.<sup>2</sup>  
<sup>1</sup> Всероссийский НИИ Экспериментальной ветеринарии им. Я. П. Коваленко (ВИЭВ) и <sup>2</sup> НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи, Москва.

Эндотелий, выстилающий внутреннюю поверхность кровеносных сосудов (ЭС), контактирует с кровью и обладает способностью получать и передавать биохимическую и физическую информацию, представлять антиген, координируя таким образом жизнедеятельность органов и тканей организма и участвуя наряду с другими иммуннокомпетентными клетками в работе иммунной системы. Эти функции осуществляются с помощью факторов, экспрессируемых и синтезируемых клетками ЭС. Провоспалительные цитокины и хемокины играют важную роль в воспалении, увеличивая трансмиграцию клеток крови в очаг воспаления, повышая секреторную активность макрофагов. Фармацевтические препараты, используемые для лечения различных болезней, попадают в кровоток и контактируют с ЭС. Результатом такого взаимодействия может быть как терапевтический, так и неблагоприятный эффект, усугубляющий заболевание или приводящий к развитию других патологических процессов. Цель исследований, результаты которых представлены в настоящей работе, заключалась в использовании первичных культур клеток ЭС крупного рогатого скота и человека для оценки способности трех препаратов — бересты экстракта сухого (БЭС), полиоксидония и ликопида — индуцировать продукцию цитокинов ИФН- $\alpha$ , ФНО- $\alpha$ , ИЛ-1, ИЛ-6 и ИЛ-8. Количественное определение цитокинов осуществляли твердофазным иммуноферментным методом (ИФА) с использованием коммерческих наборов Pro Con, а ИФН — биотестированием. БЭС индуцировал в культуре клеток ЭС синтез провоспалительных цитокинов ИЛ-6 и ИЛ-8. Через 6 ч после внесения препарата в концентрации 0.5 мг/мл уровень ИЛ-6 составил 270.1 пг/мл при 15 пг/мл в контроле. Уровень ИЛ-8 в это время составил 789.84 пг/мл при 80.01 пг/мл в контроле. БЭС не индуцировал синтез других цитокинов в культуре ЭС. Таким образом, ранее установленное лечебно-профилактическое и иммуномодулирующее действие этого препарата при вирусных инфекциях (Н. Н. Носик, В. В. Балакшин и др.,

2004; С. С. Ямникова, И. Т. Федякина и др., 2005; Г. Н. Величко, А. Ф. Шуляк и др., 2005) связано в том числе и с активированием цитокиновой сети. Ликопид в отличие от БЭС подавлял продукцию ИЛ-8 клетками ЭС, что коррелирует с противовоспалительной активностью препарата, и не индуцировал синтез других исследованных цитокинов. Полиоксидоний не индуцировал в культуре ЭС выработки ни одного из исследуемых цитокинов. Использование культур клеток ЭС для изучения воздействия фармацевтических препаратов может стать полезным инструментом для более полной и многосторонней характеристики этих препаратов при доклинических и клинических испытаниях.

**АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА *Raxb* И МАРКЕРОВ НЕЙТРАЛЬНОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ В НЕОКОРТЕКСЕ И СЕТЧАТКЕ ПЛОДОВ ЧЕЛОВЕКА IN VIVO И IN VITRO.** © Б. И. Вердиев,<sup>1</sup> Р. А. Полтавцева,<sup>1</sup> М. В. Марей,<sup>2</sup> О. В. Подгорный,<sup>1</sup> Г. Т. Сухих,<sup>2</sup> Р. Д. Зиновьева,<sup>1</sup> М. А. Александрова.<sup>1</sup> Учреждение РАН Институт биологии развития им. Н. К. Колцова РАН и <sup>2</sup> ФГУ Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. В. И. Кулакова Минздравсоцразвития, Москва, mariaaleks@inbox.ru.

Исследования в области клеточной терапии с использованием малодифференцированных стволовых/прогениторных клеток (СПК) относят к наиболее перспективным для лечения нейродегенеративных заболеваний ЦНС. Успех трансплантаций складывается из способностей СПК к миграции, дифференцировке, интеграции и экспрессии специфических факторов в мозге реципиента. Эти свойства, определяющие судьбу клеток после трансплантации, зависят от источника, из которого выделяются клетки, и условий их культивирования. Для реализации специфических потенциалов при клеточной терапии нейральные СПК в процессе культивирования должны обладать способностью экспрессировать необходимые транскрипционные факторы, регулирующие их правильное развитие и дифференцировку. Для неокортекса и сетчатки одним из важнейших транскрипционных факторов является *Raxb*, который регулирует пролиферацию нейроэпителиальных клеток, радиальной глии и клеток-предшественников, выход из клеточного цикла, направление дифференцировки, адгезию и миграцию нейробластов. В связи с этим целью работы было проведение молекулярно-генетического и иммунофенотипического анализа транскрипционного фактора *Raxb* и маркеров нейральной дифференцировки в СПК неокортекса и сетчатке плодов человека in vivo и in vitro. В исследовании применяли культивирование тканей, ПЦР, ПЦР реального времени и иммуногистохимию.

Культуры клеток выращивали по двум протоколам. Для получения адгезивных культур использовали среду DMEM/F12 (1 : 1), содержащую 10 % эмбриональной телячьей сыворотки. Для получения суспензионных культур (нейро- и ретиносфер) использовали среду DMEM/F12 (1 : 1), содержащую фактор роста фибробластов 2 (FGF-2; 20 нг/мл), эпидермальный фактор роста (EGF; 20 нг/мл), фактор ингибирования лейкемии (LIF; 10 нг/мл), гепарин (8 мкг/мл) и пенициллин/стрептомицин. Клетки культивировали при 37 °C в атмосфере, содержащей 5 % CO<sub>2</sub>. ПЦР и ПЦР в реальном времени проводили на кДНК-библиотеках, синтезированных на обработанной ДНКазой тотальной РНК с использованием

олиго-дТ-праймера. В работе использовали антитела против *Pax6* (Chemicon, 1 : 100), нестина (Chemicon, 1 : 100), КГФБ (Chemicon, 1 : 200),  $\beta$ III-тубулина (Chemicon, 1 : 400), реверрина (любезно предоставлены проф. П. П. Филипповым, МГУ), виментина (Chemicon, 1 : 4), Ki67 (Abcam, 1 : 50), NeuN (Chemicon, 1 : 1000), нейрофиламенты 68 и 200 кДа (ICN, 1 : 10).

Результаты проведенного нами молекулярно-генетического и иммунофенотипического сравнительного анализа экспрессии транскрипционного фактора *Pax6* и нейральной дифференцировки в неокортексе и сетчатке плодов человека *in vivo* и *in vitro* впервые показали, что в развивающейся сетчатке и неокортексе мозга плодов человека в период активного нейрогенеза методом ПЦР детектируется мРНК гена *Pax6*. По данным количественного ПЦР в реальном времени, уровень экспрессии гена *Pax6* в сетчатке значительно выше по сравнению с неокортексом, что значительно отличало исследованные ткани. Сходные результаты были получены при анализе клеточных культур. В культурах СПК сетчатки экспрессия *Pax6* была выше, чем в культивированных клетках мозга, что соответствовало результатам, полученным на нативных тканях. Иммуногистохимический анализ подтвердил, что использованные нами условия культивирования СПК неокортекса и сетчатки не блокируют их региональную специфичность. Было показано сходство по экспрессии нестина и  $\beta$ III-тубулина в неокортексе и сетчатке на ранних сроках развития, а позже — различия по фенотипам клеток и их распределению. В первичных культурах (без специфической стимуляции) наблюдается дифференцировка, в ходе которой реализуются генетически детерминированные клеточные потенции, свойственные нативным тканям. В связи с этим можно полагать, что при гетеротрансплантации прогениторных клеток мозга в сетчатку глаза у экспериментальных животных будет реализовано нейротрофическое влияние клеток, но не их функциональная интеграция.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 08-04-00081) и по контракту с Федеральным агентством по науке и инновациям № 02.512.12.2008.

**ПРОЛИФЕРАЦИЯ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКА КЛЕТОК САХАЛИНСКОГО ОСЕТРА В КУЛЬТУРЕ.** © Х. С. Вуинякова. Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва.

Сахалинский осетр *Acipenser mikadoi* представляет собой редкий исчезающий вид. Культура клеток сахалинского осетра была получена из фрагмента грудного плавника с захватом прилежащих мягких тканей. На начальном этапе роста в культуре имелись клетки разных типов, среди которых можно было выделить как типичные фибробласты, так и клетки эпителиального происхождения, миофибробласты и др. После примерно пяти пересевов в культуру стали преобладать клетки фибробластной морфологии. Эти клетки росли с постоянной скоростью более 1 года, пройдя за это время около 80 удвоений популяции. В отсутствие сыворотки клетки переходили в пролиферативный покой ( $G_0$ -покой). При длительном пребывании без замены среды клетки сливались, образуя мышечные фибриллы длиной в несколько сантиметров. Эти фибриллы могли ветвиться и со временем приобретали попереч-

ную исчерченность. Примерно через 40 сут после образования, фибриллы подвергались обратной инволюции: теряли форму, откреплялись и погибали. Индукция адипогенной дифференцировки приводила к прекращению пролиферации и появлению в существенной части клеток липофильных включений. Однако количество этих включений было ограниченным, клетки с включениями имели разнообразную морфологию и не были похожи на адипоциты. Индукция остеогенной дифференцировки приводила к появлению клеток, продуцирующих минерализованный внеклеточный матрикс, и образованию костных узелков. Клетки обладали теломеразной активностью. Длина теломер была очень гетерогенной и составляла от нескольких до 20 т. п. н. Хромосомный анализ выявил типичный для осетров набор хромосом. Варибельность количества хромосом оказалась очень высокой (в среднем  $247 \pm 33$  при моде в 248 хромосом). Во всех хромосомах в теломерных и центромерных районах расположены GC-богатые последовательности. Обнаружена гетерогенность по распределению AT- и GC-богатых последовательностей между хромосомами. Длинные хромосомы преимущественно AT-богатые, мелкие содержат больше GC-богатых последовательностей. Несколько мелких хромосом отличаются особенно высоким содержанием GC-богатых последовательностей. Работа представляет собой первый опыт получения культуры клеток сахалинского осетра и анализа его кариотипа.

**ОСОБЕННОСТИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ БЕЛКОВ БАЗАЛЬНОЙ МЕМБРАНЫ И ИХ ДВУХКОМПОНЕНТНЫХ СМЕСЕЙ НА ГИДРОФОБНЫХ ПОВЕРХНОСТЯХ.**

© Д. А. Гамазин,<sup>1</sup> Е. Б. Ревнова,<sup>1</sup> И. И. Воронкина,<sup>2</sup> Г. П. Пинаев.<sup>2</sup> <sup>1</sup> С.-Петербургский государственный политехнический университет. dklimenok@mail.ru, и <sup>2</sup> Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Внеклеточный матрикс участвует в поддержании организации тканей и органов, влияя на морфологию и функционирование контактирующих с ним клеток, процессы морфогенеза и дифференцировки. *In vivo* клетки взаимодействуют с трехмерной структурой, образуемой белками и протеогликанами внеклеточного матрикса. Примером такой структуры является базальная мембрана. Ее белковые компоненты используются для адгезии клеток *in vitro*. Первоначально предполагалось, что нанесенные белки распределяются по подложке равномерно. Однако полученные нами предварительные данные показали, что поверхность, на которую затем наносят культивируемые клетки, покрыта белками не полностью, а само белковое покрытие в зависимости от условий нанесения имеет разную структуру. В связи с этим настоящая работа была посвящена изучению распределения на гидрофобной поверхности мажорных белков базальной мембраны. В дальнейшем такие модифицированные поверхности будут использованы для оценки их влияния на поведение клеток модельных линий (эпидермоидной карциномы A431, кератиноцитов). Растворы фибронектина, ламинина, коллагена IV типа и их двухкомпонентные смеси (по 1 мкг каждого белка) наносили на силиконизированные стекла и инкубировали в течение 18 ч при 6 °C либо в течение 1 ч при 37 °C. Белки выявляли методом непрямого иммунофлуоресцентного окрашивания; трехмерную структуру образуемого покрытия изучали методом сканирующей электронной микроскопии.



Изученные комплексы белков внеклеточного матрикса образовывали структуры различного типа. Фибронектин и ламинин как по отдельности, так и в двухкомпонентной смеси покрывали подложку неравномерно. При иммунофлуоресцентном окрашивании белковые коацерваты выявлялись в виде ячеистой сети; по краю нанесенной капли образовывались отдельные белковые преципитаты и их ветвящиеся кластеры, что согласуется с известными данными о концентрическом структурировании белково-солевых капель. Ламинин 2/4 образовывал более однородное покрытие при инкубации в течение 1 ч при 37 °С. Повышение концентрации белка (до 100 мкг/мл) и присутствие  $\text{CaCl}_2$  приводили к нарушению однородности: в препарате появлялись многочисленные белковые агрегаты, возможно являющиеся зародышами мультимеризации белка. В случае фибронектина по краю капли всегда присутствовали ветвящиеся древовидные структуры; не наблюдалось заметного влияния условий инкубации и присутствия ионов  $\text{Ca}^{2+}$ .

Сканирующая электронная микроскопия позволила установить, что характерные для ламининового и фибронектинового матриксов ячейки представляют собой оптические срезы чешуйчатых белковых агрегатов, ориентированных перпендикулярно поверхности препарата. Структуры, образуемые как фибронектином и ламинином 2/4 по отдельности, так и их двухкомпонентной смесью, были принципиально одинаковы. Коллаген IV формировал гомогенную пленку с протяженными складками. Подобным образом выглядели смеси фибронектина и ламинина с коллагеном. По-видимому, фибронектин и ламинин включались в формируемый коллагеном гель.

Таким образом, смеси белков внеклеточного матрикса при адсорбции из водно-солевого раствора на гидрофобную поверхность образуют различные структуры, которые могут оказывать влияние на поведение клеток в культуре. Представляется возможным варьировать характеристики покрытия, изменяя способ нанесения белка, и оказывать направленное влияние на свойства культивируемых клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке по госконтракту 2007 г. № 02.522.11.2006/03.

**ПРОИСХОЖДЕНИЕ В ОНТОГЕНЕЗЕ И ДИФФЕРЕНЦИРОВОЧНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ДЕРМАЛЬНОЙ ПАПИЛЛЫ ВОЛОСЯНОГО ФОЛЛИКУЛА.** © К. Ю. Гнедева,<sup>1,2</sup> Э. С. Черных,<sup>2</sup> Е. А. Воротеляк,<sup>2</sup> А. В. Васильев,<sup>2</sup> А. В. Терских,<sup>1</sup> В. В. Терских.<sup>2</sup> <sup>1</sup> Burnham Institute for Medical Research, San Diego, USA. Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН, vorotelyak@yandex.ru.

Волосной фолликул представляет собой сложно организованный орган, возникающий в онтогенезе в результате серии эпителио-мезенхимных взаимодействий. Мезенхимный компонент волосного фолликула составляют клетки дермальной папиллы (ДП). Во взрослом организме ДП играет критическую роль в регуляции цикла роста волоса. В литературе имеются данные относительно адипо- и остеогенного потенциала клеток ДП, что позволяет исследователям относить их к мезенхимным стволовым клеткам. Однако в последнее время появились указания на то, что ДП может быть нишей так называемых мультипотентных стволовых клеток. Происхождение кле-

ток ДП в онтогенезе не выяснено. Используя трансгенных мышей Wnt1-Cre/Floxed-EGFP линии C57 black 6, мы показали, что в состав ДП входит большое количество клеток, позитивных по экспрессии репортерного гена GFP, что свидетельствует об их происхождении из нервного гребня. При этом позитивные клетки обнаружены в ДП как вибрисс, так и волосных фолликулов туловища животного.

Клетки ДП могут быть выделены и культивированы. Мы разработали метод выделения клеток ДП человека и животных, позволяющий увеличить их выход. При этом полученные культуры имели признаки, характерные для ДП клеток: морфология, характер роста и экспрессия щелочной фосфатазы. Клетки ДП в отличие от других типов мезенхимных клеток были способны индуцировать эпидермальный тубулогенез. При инкубировании в индукционных средах они были способны к адипо- и остеогенной дифференцировке и экспрессировали соответствующие маркеры. Кроме того, выяснилось, что они могут быть также подвергнуты нейральной дифференцировке и после индукции экспрессировать нейральные маркеры GFAP и пар2.

Данные литературы и наши результаты демонстрируют, что ДП может быть нишей мультипотентных клеток, происходящих в онтогенезе из нервного гребня. Таким образом, они потенциально могут быть удобным источником взрослых стволовых клеток.

**СИГНАЛЬНЫЕ ПУТИ, РЕГУЛИРУЮЩИЕ НОРМАЛЬНОЕ И ПАТОЛОГИЧЕСКОЕ РАЗВИТИЕ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК.** © О. Ф. Гордеева. Институт биологии развития. РАН, Москва, olgagordecva@yandex.ru.

Плюрипотентные стволовые клетки представляют собой уникальную экспериментальную модель для изучения фундаментальных механизмов, вовлеченных в регуляцию процессов раннего развития млекопитающих, а также эмбриональных неоплазий. Линии плюрипотентных стволовых клеток, полученные из различных клеточных источников, обладают сходными биологическими свойствами — неограниченным самообновлением и способностью дифференцироваться во все типы соматических и половых клеток. Дисбаланс в регуляции процессов пролиферации и дифференцировки, возникающий в результате генетических повреждений, приводит к малигнизации плюрипотентных клеток и развитию эмбриональной тератоканцеромы. Клеточные линии эмбриональной тератоканцеромы имеют варибельный потенциал к дифференцировке и представляют интерес для изучения нарушений программы специализации ранних эмбриональных клеток.

Сигнальные пути факторов семейства TGF $\beta$ , интегрированные в единую регуляторную сеть клеток, вовлечены в контроль различных процессов развития — дифференцировки ранних эмбриональных клеток и внезародышевых структур, формирования осей поляриности и морфогенетических преобразований зародыша, а также участвуют в процессах опухолевого роста в тканях развивающегося и взрослого организма. Результаты наших исследований различных ветвей сигнальных путей семейства TGF $\beta$ , регулирующих самые ранние этапы детерминации клеток-предшественников трех зародышевых листков и линии половых клеток из плюрипотентных стволовых



клеток различного происхождения и клеток тератокарциномы, показали, что определение клеточной судьбы происходит вследствие изменения баланса факторов Nodal, Activin, Lefty, BMP, TGF $\beta$  и GDF. Сравнительное исследование транскрипционных профилей факторов семейства TGF $\beta$  (Activin, Nodal, Lefty1, Lefty2, BMP4, TGF $\beta$ 1 и GDF3), их рецепторов (Actr1, Actr2, Bmpr1 и T $\beta$ r1), белков-трансдюсеров Smad 2, 4, 5, специфических и транскрипционных факторов Oct4, Nanog, Gata4, 6, Afp, Bry, Pitx2, Nestin, Pax6 и Tdgf1/crpto в 42 различных экспериментальных ситуациях позволило установить ряд корреляций в экспрессии генов, регулирующих самообновление и детерминацию плюрипотентных и тератокарциномных клеток. В наших экспериментах было установлено, что экспрессия факторов Nodal, Lefty1, Lefty2 и GDF3 снижается параллельно с экспрессией генов Oct4 и Nanog в процессе спонтанной дифференцировки в производные трех зародышевых листков и внезародышевую энтодерму, а также в процессе индуцированной дифференцировки, моделирующей дифференцировку передних структур зародыша на стадии гастрюляции (anterior pattern). Показано, что уровень экспрессии этих факторов в эмбриональных стволовых (ЭСК) и эмбриональных герминативных (ЭГК) клетках зависит от присутствия в среде фактора ингибирования лейкемии LIF, что позволяет предположить существование взаимодействия сигнальных путей Nodal, Lefty1, Lefty2, GDF3 и LIF/Jak/STAT3 в плюрипотентных стволовых клетках мыши. Впервые получены данные о мультифункциональной роли факторов Activin на начальных стадиях дифференцировки ЭСК и ЭГК. Обнаружено, что экспрессия фактора ActivinA резко снижается в эмбриональных телах и после удаления фактора LIF из среды для культивирования ЭСК и ЭГК, однако значительно возрастает при индукции дифференцировки ретиновой кислотой. В тератокарциномных клетках в отличие от ЭСК и ЭГК экспрессия генов факторов Activin не выявлена ни в одной из экспериментальных ситуаций. Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что в плюрипотентных стволовых клетках в отличие от трансформированных клеток устанавливается специфическая сигнальная регуляторная сеть, формируемая факторами семейства TGF $\beta$ , которая обеспечивает регуляцию их пролиферации и переключение программ дифференцировки в различных направлениях при нормальном развитии.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 08-04-01307).

**АМНИОТИЧЕСКАЯ ЖИДКОСТЬ — ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ИСТОЧНИК КЛЕТОК ДЛЯ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ.** © Д. А. Давыдова,<sup>1</sup> Е. А. Воротеляк,<sup>1</sup> Ю. А. Смирнова, Ю. А. Романова,<sup>2</sup> А. В. Васильев,<sup>1</sup> В. В. Терских.<sup>1</sup> Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН, davydovad@mail.com, и <sup>2</sup> ФГУ Российский кардиологический научно-производственный комплекс, Москва.

Использование стволовых клеток в клеточных технологиях имеет определенные ограничения. Применение эмбриональных стволовых клеток, обладающих наиболее широким потенциалом, связано с рядом трудноразрешимых вопросов. В то же время процедура получения постнатальных стволовых клеток часто бывает технически

сложной, а их дифференцировочный потенциал, как правило, ограничен. Перспективными для использования в клеточных технологиях могут оказаться занимающие промежуточное положение фетальные стволовые клетки и в особенности клетки из экстраэмбриональных тканей, выделение которых не вызывает никаких этических споров. Амниотическая жидкость человека содержит гетерогенную популяцию клеток эмбрионального и фетального происхождения. В последнее время появились данные о присутствии в ней клеток, способных к длительной пролиферации *in vitro* и дифференцировке в производные трех зародышевых листков. Цель данной работы — выделение клеток из амниотической жидкости человека и определение их дифференцировочного потенциала. Клетки, выделенные из амниотической жидкости трех пациентов, были охарактеризованы с помощью иммуногистохимии, проточной цитофлуориметрии и ОТ-ПЦР. Полученные результаты показали, что клетки от трех доноров экспрессируют маркеры разных типов дифференцировки: мезенхимного (CD90, CD73, CD105, CD13, CD44, CD71 и CD29), нейрального ( $\beta$ 3-tubulin, Nestin, GFAP и Pax6), а также эпителиального (Кератин 10 и p63). Кроме того, показана экспрессия этими клетками некоторых маркеров эмбриональных стволовых клеток, таких как Oct4, Nanog, Rex-1, а также Pitx-2. В то же время экспрессия других маркеров (Sox2 и Stella) не наблюдается. Трансплантация клеток амниотической жидкости иммунодефицитным животным не приводит к образованию тератом. При культивировании в индукционных средах клетки способны дифференцироваться в адипо- и остеогенном направлениях. Клетки амниотической жидкости не контрактируют коллагеновый гель в течение первых 5—7 сут, что отличает их от мезенхимных стволовых клеток. В то же время наблюдаются активная пролиферация клеток и образование тубулярных структур и цист, окрашивающихся антителами к цитокератинам. Полученные данные позволяют предположить, что выделенные клетки обладают широкими дифференцировочными и морфогенетическими потенциалами. Это наряду с отсутствием формирования тератом при трансплантации амниотических клеток *in vivo* делает их привлекательным объектом для исследований в области клеточной терапии.

**КУЛЬТУРА СКЕЛЕТОГЕННЫХ КЛЕТОК КАК ОСНОВА КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ В ТРАВМАТОЛОГИИ И ОРТОПЕДИИ.** © Р. В. Деев,<sup>1</sup> Н. В. Цупкина,<sup>2</sup> И. Я. Бозо,<sup>1</sup> В. С. Сергеев,<sup>1</sup> А. А. Исаев,<sup>3</sup> В. В. Зениц,<sup>2</sup> В. С. Горностаев,<sup>4</sup> Т. А. Куляба,<sup>5</sup> Н. Н. Корнилов,<sup>5</sup> В. Г. Гололобов,<sup>1</sup> Р. М. Тихилов,<sup>5</sup> Г. П. Пинаев.<sup>2</sup> <sup>1</sup> Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова, <sup>2</sup> Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, <sup>3</sup> ОАО «Институт стволовых клеток человека», Москва, <sup>4</sup> ООО «Биолот», Санкт-Петербург, и <sup>5</sup> Российский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Р. Р. Вредена, Санкт-Петербург.

Повреждения органов скелета, построенных из костной и хрящевой тканей, по-прежнему составляют значимую проблему современной клинической медицины. В значительной степени потенциал хирургической техники для коррекции данной патологии исчерпан, в связи с чем представляется перспективным внедрение клеточных биотехнологий в ортопедическую практику. Совместные исследования в этой области нашими коллективами были

начаты с экспериментальных исследований около 10 лет назад. На первом этапе отрабатывалось получение культуры мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (ММСК) экспериментальных животных — кроликов. ММСК получали из костного мозга животных. После индукции направленной остеогенной и хондрогенной дифференцировки клетки исследовали методами световой микроскопии, цитохимии, иммуноцитохимии и электронной микроскопии. Было установлено, что часть клеток культуры обладает остеогенным и хондрогенным потенциалом. Влияние данных клеток на репаративные процессы в костной и хрящевой ранах были исследованы в экспериментах *in vivo*. В качестве модельных повреждений на первоначальном этапе нами использовались дефект костей свода черепа и дефект гиалинового хряща коленного сустава. С использованием современных лучевых методов медицинской визуализации показано положительное влияние пересаженных аутогенных культур на репаративные процессы в поврежденных органах. Для удовлетворения клинических запросов в замещении больших по протяженности дефектов опорных костей использована тактика тканевой инженерии, при которой полученная культура клеток совмещается с биорезорбируемым носителем. В качестве модели использован дефект большеберцовой кости кроликов, в который пересаживались фрагменты деминерализованного костного матрикса, заселенного остеогенными клетками. Результаты эксперимента подтвердили положительное влияние клеточных технологий.

Накопленные экспериментальные данные позволили инициировать ограниченные клинические испытания на базе специализированного стационара. Манипуляции выполняли в соответствии с решением ученого совета и разрешения этического комитета Института, а также на основании добровольного информированного согласия пациентов. На первом этапе в ходе диагностической артроскопии получали фрагмент жирового тела коленного сустава в объеме около 1 см<sup>3</sup>. В дальнейшем получали культуру клеток, обладавших свойствами ММСК. Установлено, что выделенная популяция клеток адгезируется к поверхности культурального пластика; обладает набором поверхностных маркеров, близких к маркерам ММСК: CD73 (96.3—100.0 %), CD44 (92.1—99.4 %), CD105 (94.9—100.0 %), CD90 (94.9—99.0 %); в минимальном количестве экспрессирует гемopoэтические маркеры CD34 (0.05—3.0 %), CD45 (0.01—22.0 %), CD71 (–), CD106 (2.03—13.20 %), CD11b (3.7 %), CD10 (2.8—4.0 %) и не экспрессирует CD133. При индукции дифференцировки в ортодоксальных направлениях — остеогенном, хондрогенном и адипоцитарном — показано, что клетки полученной культуры обладают широким дифференцировочным потенциалом. Остеогенная дифференцировка была выявлена обнаружением высокой синтетической активности щелочной фосфатазы, экспрессии остеокальцина и способности формировать минеральные преципитаты; хондрогенная — формированием хондроцитарных сфероидов, гистохимическим обнаружением гликозаминогликанов и коллагена II типа; адипогенная — накоплением в цитоплазме большого количества жировых капель, положительно окрашивающихся суданом III.

Таким образом, в ходе работы отработаны протоколы получения ММСК животных и человека, определены методические подходы для их дальнейшего использования в интересах пациентов травматолого-ортопедического профиля.

**ЭФФЕКТ ЭСТРАДИОЛА НА ИЗМЕНЕНИЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО  $\text{Ca}^{2+}$  В КЛЕТКАХ ГРАНУЛЕЗЫ СВИНЬИ, СТИМУЛИРОВАННОЕ ПРОЛАКТИНОМ И ТЕОФИЛЛИНОМ.** © В. Ю. Денисенко, Т. И. Кузьмина. Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных РАСХН, Санкт-Петербург—Пушкин, prof.kouzmina@mail.ru.

Целью работы явилось исследование влияния эстрадиола на взаимодействие между пролактином и теофиллином при изменении концентрации цитоплазматического  $\text{Ca}^{2+}$  в клетках гранулезы свиней. В экспериментах использовали яичники свиней на стадии фолликулярного роста, без видимой патологии. Клетки гранулезы выделяли из фолликулов диаметром 3—6 мм. Инкубацию клеток гранулезы проводили в среде Дюльбеко в отсутствие кальция. Концентрацию цитоплазматического кальция в клетках гранулезы свиней изучали с помощью флуоресцентного зонда Фура-2АМ. Для измерения интенсивности флуоресценции зонда использовали флуоресцентный спектрофотометр «Hitachi».

Так как в инкубационной среде отсутствовал  $\text{Ca}^{2+}$ , увеличение концентрации кальция в цитоплазме было связано с освобождением  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных депо. Отдельно пролактин в концентрации 50 нг/мл или теофиллин в концентрации 10 мМ вызывал в клетках гранулезы увеличение концентрации цитоплазматического  $\text{Ca}^{2+}$ . Однако при совместном действии пролактина и теофиллина в клетках гранулезы не отмечали дополнительного увеличения концентрации цитоплазматического  $\text{Ca}^{2+}$  в сравнении с действием отдельно каждого из реагентов. Для определения внутриклеточных депо, из которых освобождают  $\text{Ca}^{2+}$  пролактин и теофиллин, использовали ингибитор  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФаз тапсигаргин (10 мкМ). С помощью этого ингибитора на клетках гранулезы свиньи было показано, что пролактин и теофиллин освобождают  $\text{Ca}^{2+}$  из различных внутриклеточных депо (пролактин из  $\text{IP}_3$ -чувствительных, теофиллин — из рианодин-чувствительных). Внесение в среду инкубации с клетками гранулезы ингибитора протеинкиназы С Ro 31-8220 (10 нг/мл) приводило к росту концентрации цитоплазматического  $\text{Ca}^{2+}$ . После обработки гранулезы ингибитором протеинкиназы С добавление пролактина или теофиллина, а также совместное действие пролактина и теофиллина не стимулировало увеличение концентрации цитоплазматического  $\text{Ca}^{2+}$ . Добавление эстрадиола в концентрации 1 мкг/мл не оказывало влияния на цитоплазматический  $\text{Ca}^{2+}$  в клетках гранулезы. В обработанных эстрадиолом клетках использование отдельно пролактина или теофиллина стимулировало увеличение концентрации цитоплазматического  $\text{Ca}^{2+}$ . При совместном действии пролактина и теофиллина в присутствии эстрадиола в клетках гранулезы отмечали дополнительный рост концентрации цитоплазматического  $\text{Ca}^{2+}$ . Ингибирование протеинкиназы С приводило к увеличению концентрации цитоплазматического  $\text{Ca}^{2+}$ . Последующее добавление к обработанным ингибитором клеткам пролактина или теофиллина не оказывало влияния на концентрацию цитоплазматического  $\text{Ca}^{2+}$ , в то время как стимулированное совместным действием пролактина и теофиллина увеличение концентрации цитоплазматического  $\text{Ca}^{2+}$  снижалось в присутствии ингибитора протеинкиназы С.

Таким образом, при совместном действии пролактина и теофиллина в присутствии эстрадиола дополнительно увеличивается концентрация  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазме клеток



гранулы. Пролактин и теофиллин активируют два различных независимых внутриклеточных депо, и эстрадиол, возможно, способствует образованию связи между этими внутриклеточными депо. Кроме того, в процессе образования возможной связи между внутриклеточными депо активное участие принимает протеинкиназа С.

**ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРОВ МИТОЗА НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ АДЕНИЛАТЦИКЛАЗНОЙ СИСТЕМЫ ИНФУЗОРИИ *DILEPTUS ANSER*. © К. В. Деркач,<sup>1</sup> А. О. Шпаков,<sup>1</sup> З. И. Успенская,<sup>1</sup> Л. А. Кузнецова,<sup>1</sup> Л. А. Юдин.<sup>2</sup>** <sup>1</sup> Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН и <sup>2</sup> Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, [alyudin@mail.ru](mailto:alyudin@mail.ru).

В клетках позвоночных животных состояние микротрубочек и микрофиламентов играет важную роль в функционировании гормональных сигнальных систем, включающих в себя в качестве сопрягающего компонента гетеротримерные G-белки. В то же время данные о взаимосвязи цитоскелета и сигнальных каскадов у одноклеточных организмов фрагментарны и противоречивы. Ранее нами было показано, что гуаниновые нуклеотиды, фторид натрия и форсколин, активаторы G-белков и аденилатциклазы (АЦ), а также гормоны позвоночных животных (биогенные амины, пептиды инсулинового суперсемейства и глюкагон) влияют на активность аденилатциклазной системы (АЦС) свободноживущей инфузории *Dileptus anser*. Цель настоящей работы состояла в изучении влияния ингибиторов митоза — колхицина и винбластина — на АЦС этой инфузории и ее регуляцию гормональными и негормональными агентами. Обработка клеток *D. anser* колхицином и винбластином (10 мкМ, 40 мин, 25 °С) *in vivo* вызывала небольшое снижение базальной активности АЦ, но практически не влияла на активность фермента, стимулированную форсколином, взаимодействующим с каталитическим сайтом АЦ. Эти данные указывают на то, что сам фермент АЦ не является мишенью действия ингибиторов. При этом обработка колхицином и винбластином приводила к значительному снижению, а в ряде случаев и к полному блокированию стимулирующих АЦ эффектов гуаниновых нуклеотидов (ГТФ и ГТФγS) и гормонов (адреналина и глюкагона), действующих как по отдельности, так и совместно. На примере колхицина было показано, что IC<sub>50</sub> для его ингибирующего влияния на стимуляцию АЦ гормонами и гуаниновыми нуклеотидами составляют от 2 до 5 мкМ. Наиболее чувствительными к действию ингибиторов оказались АЦ-эффекты адреналина и совместно адреналина и гуаниновых нуклеотидов. Полученные результаты свидетельствуют о том, что в присутствии ингибиторов митоза в целых клетках нарушается функциональное сопряжение рецепторов с гетеротримерными G-белками. С другой стороны, показано, что колхицин и винбластин практически не влияют на активность АЦС в гомогенате инфузорий. Это указывает на то, что в основе их ингибирующего влияния на АЦС лежат процессы нарушения сборки микротрубочек (предотвращение полимеризации тубулина в случае колхицина и его деполимеризация в случае винбластина), а не взаимодействие с сигнальными белками, компонентами АЦС. Таким образом, нами впервые показано, что ингибиторы митоза подавляют функциональную активность чувствительной к гормонам АЦС инфузории *D. anser*, а их действие, как мы полагаем, связано с

нарушением сборки микротрубочек, ассоциированных с компонентами АЦС — рецепторами и G-белками.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 09-04-00672а).

**ИГЛОКОЖИЕ КАК МОДЕЛЬ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МЕХАНИЗМОВ ДЕДИФФЕРЕНЦИРОВКИ И НАПРАВЛЕННОЙ СПЕЦИАЛИЗАЦИИ КЛЕТОК. © И. Ю. Долматов.** Институт биологии моря им. А. В. Жирмунского ДВО РАН, Владивосток.

Современные методические подходы к получению клеточного материала и созданию искусственных органов разделяются на два направления. Одно из них, ставшее уже традиционным, включает в себя изучение свойств стволовых клеток и механизмов их направленной дифференцировки. Другое направление, возникшее в последние годы, подразумевает изучение механизмов дедифференцировки специализированных клеток. Было показано, что кратковременное воздействие ряда генов, в частности *Oct4* и *Sox2*, трансформирует фибробласты в клетки, по своим свойствам близкие к стволовым. В то же время известно, что у многих животных имеются генетически запрограммированные механизмы как дедифференцировки и трансформации специализированных клеток в плюрипотентное состояние, так и обратный процесс ре- и трансдифференцировки клеток. В полном объеме эти механизмы активируются при регенерации, особенно у тех животных, у которых источником регенерационного материала являются дифференцированные клетки. В результате дедифференцировки специализированные клетки упрощаются, вступают в митотический цикл, пролиферируют и участвуют в морфогенезе. Механизмы восстановления, основанные на дедифференцировке, широко распространены в природе и обуславливают ярко выраженную регенерацию многих видов как позвоночных, так и беспозвоночных животных.

Примером животных, у которых восстановление происходит исключительно за счет дедифференцировки, являются иглокожие. Представители этой группы могут регенерировать различные ткани и органы, а также восстанавливать значительные части тела. Подобно планариям, некоторые виды голотурий и морских звезд хорошо регенерируют после разделения их тела на несколько фрагментов. Иглокожие способны к регенерации на всех стадиях онтогенеза, от эмбрионов до взрослых особей. Кроме того, эти животные способны к бесполому размножению и аутомии. Такие хорошие регенераторные способности и высокая скорость восстановительного процесса у иглокожих обуславливаются легкостью специализированных клеток к дедифференцировке.

В зависимости от степени повреждения и типа ткани уровень дедифференцировки и судьба клеток могут быть различными. В частности, достаточно лабильны энтероциты, нейроны и глиальные клетки. Последние могут давать как основные типы глии, так и различные типы нейронов. Одним из ярких примеров такой лабильности являются миеоэпителиальные клетки целомического эпителия. При любом типе повреждения они полностью извращаются от миеофиламентов и по морфологическим критериям неотличимы от эпителиальных. Тем не менее уровень их дедифференцировки зависит от регенерирующего органа.



При восстановлении дыхательной системы голотурий, водных легких, эти клетки сохраняют свою специфичность и после нескольких циклов деления вновь дифференцируются в миоэпителиальные клетки. В процессе регенерации кишечника происходит более глубокая трансформация миоэпителиальных клеток, трансдифференцировка. В этом случае после дедифференцировки и 3—4 делений они дифференцируются в пищеварительные клетки кишки. В связи с тем что у иглокожих имеются механизмы глубокой перестройки работы генома клеток, эти животные являются хорошими модельными объектами для изучения дедифференцировки и направленной специализации клеток. В настоящее время показано, что при регенерации у иглокожих активируется ряд генов, контролирующих формирование осей тела и тканеспецифичную дифференцировку. Это такие гены, как *BMP*, *Wnt*, транскрипционный фактор *GATA*, фактор дифференцировки *CD34* и некоторые другие. Дальнейшее исследование процессов дедифференцировки и трансдифференцировки у иглокожих может внести определенный вклад в понимание механизмов трансформации клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 08-04-00284).

**МИОГЕННАЯ И НЕЙРОНАЛЬНАЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКА КЛЕТОК ЛИЧИНОК МИДИИ *MYTILUS TROSULUS* IN VITRO.** © В. А. Дячук, Н. А. Одицова. Институт биологии моря им. А. В. Жирмунского ДВО РАН, Владивосток, slavad83@gmail.com.

На сегодняшний день разработанные технологии получения первичных клеточных культур двустворчатых моллюсков из эмбрионального и личиночного материала позволяют успешно изучать дифференцировку клеток этих животных *in vitro*. Цель данной работы — исследовать миогенную и нейрональную дифференцировку личиночных клеток мидии и взаимодействие мышечных клеток и нейронов *in vitro*.

Ранее мы показали, что *in vivo* мышечные белки толстых филаментов экспрессируются одновременно в первых мышечных клетках личинок мидии и задолго до начала формирования мышечной системы личинки мидии (Dyachuk, Odintsova, 2009). Мышцы взрослого моллюска закладываются на стадии раннего велигера и развиваются параллельно с мускулатурой личинки. Обнаружено, что на ранних стадиях развития личинок появляются поперечнополосатые миофибриллы. Во время метаморфоза происходит кардинальная перестройка мышечной системы личинки, в результате которой развивается полноценная гладкая мускулатура взрослых моллюсков, способная к состоянию заpirательного тонуса. Установлено, что первые нервные клетки появляются раньше мышечных клеток личинок двустворчатых моллюсков.

В первичной культуре клеток мидии, используя иммунофлуоресцентное маркирование, мы показали, что через 2 ч на периферии клеток появляются нити Ф-актина, а через 6 ч экспрессируются одновременно мышечные белки толстых нитей. Через 12 ч мы обнаружили чередующееся распределение белков толстых нитей и актина, создающее поперечную исчерченность. Именно в это время были зарегистрированы первые спонтанные сокращения клеток. Через 20 сут после начала культивирования ис-

черченность распределения толстых и тонких нитей сменилась на диффузное расположение белков в цитоплазме клеток, свойственное гладким мышцам взрослой мидии. В экспериментах с ингибиторами рецепторов интегринов установлено отсутствие экспрессии мышечных белков толстых нитей. Вероятно, сборка мышечных филаментов в клетках личинок мидии — это интегринзависимый процесс.

Обнаружено, что первые серотонин- и FMRFамид-иммунореактивные клетки появляются через 4 ч после их посадки в чашки. На начальных этапах культивирования расположение мышечных и нейрональных клеток хаотично. Однако на более поздних сроках культивирования, после терминальной дифференцировки миогенных и нейрональных клеток, происходила ассоциация клеток в колонии. Интересно, что в центре каждой колонии располагались серотонин- и FMRFамид-иммунореактивные клетки, а миоциты располагались на периферии и объединялись с другими агрегатами, формируя сеть сокращающихся клеток. Полноценной миодифференцировки клеток мидии, сопровождающейся сборкой мышечных белков в саркомеры, не происходила в клетках, культивированных на коллагене (1 мг/мл). В этом случае мы наблюдали отсутствие экспрессии белков толстых нитей на начальных стадиях культивирования (24 ч) и редко формирующиеся неправильно ориентированные саркомеры на поздних стадиях культивирования (20 сут). В таких клетках актиновые и парамозиновые (или миозиновые) фибриллы оказывались закрученными вокруг ядра клеток, образуя так называемые миоболлы. В мышечных клетках позвоночных животных такие структуры образуются при культивировании их на неадгезивных субстратах или в присутствии агентов, деполимеризующих микротрубочки.

Таким образом, нами установлено, что первичные культуры клеток личинок, полученные с ранних стадий развития мидии, способны дифференцироваться в миогенном и нейрональном направлениях. Данная модель является адекватной системой для дальнейшего изучения молекулярных основ терминальной дифференциации мышц и нейронов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 09-04-01326-а и 09-04-98529-р\_восток\_а) и ДВО РАН (проекты 09-П-С0-06-001, 09-И-П22-04 и 09-III-B-06-252).

**ВНЕКЛЕТОЧНЫЙ БЕЛОК ТЕПЛОВОГО ШОКА 70 кДа ЗАПУСКАЕТ ТРАНСАКТИВАЦИЮ РЕЦЕПТОРА ЭФР В КЛЕТКАХ A431.** © А. П. Евдонин, Д. А. Попова, Н. Д. Медведева. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Известно, что лиганднезависимую активацию рецептора ЭФР, которую называют трансактивацией рецептора ЭФР, вызывают две группы факторов — агонисты других рецепторов и стрессовые воздействия на клетку. Механизм трансактивации рецептора ЭФР при действии агонистов других рецепторов, таких как гормоны или цитокины, подробно изучен. При стрессовых воздействиях молекулярный фактор, который действует на клетку и запускает процесс передачи сигнала, неочевиден. Ранее мы обнаружили, что на начальных этапах теплового шока

клетки карциномы человека A431 секретируют во внеклеточную среду белок теплового шока 70 кДа (Hsp70) и одновременно происходит активация рецептора ЭФР. Мы предположили, что именно Hsp70 вызывает активацию рецептора ЭФР. Для доказательства этого предположения исследовали действие кондиционной среды клеток, подвергнутых тепловому шоку, и действие внеклеточного Hsp70 на клетки A431. Среда клеток, подвергнутых нагреванию, запускала трансактивацию рецептора ЭФР в контрольных клетках, в то же время при удалении из этой среды Hsp70 трансактивации рецептора ЭФР не наблюдалось. Следовательно, при тепловом шоке рецептор ЭФР активируется по аутокринному механизму и внеклеточный Hsp70 играет решающую роль в этом процессе. Известно, что внеклеточный Hsp70 активирует группу рецепторов, в числе которых toll-like-рецепторы 2 и 4 (TLR2/4), которые экспрессируются в клетках A431. Обнаружено, что внеклеточный Hsp70 активирует TLR2/4 в клетках A431, о чем судили по присоединению адапторного белка MyD88 и активации NF-κB, при этом происходит образование комплексов TLR2/4 с рецептором ЭФР. Действие на клетки Hsp70 вызывало также активацию рецептора ЭФР, ERK1/2, фосфолипазы C и транскрипционного фактора STAT3. Нейтрализующие антитела к TLR2/4 подавляли трансактивацию рецептора ЭФР, вызванную тепловым шоком и внеклеточным Hsp70. Таким образом, трансактивация рецептора ЭФР при тепловом шоке является результатом выхода из клеток Hsp70, активации TLR2/4 и перекреста сигнальных путей, запускаемых рецептором ЭФР и TLR2/4.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 08-04-00579a).

**ПРОЛИФЕРАЦИЯ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКА РАЗЛИЧНЫХ ТЕЛОМЕРИЗОВАННЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА.**  
© Е. Е. Егоров. Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва, uegorov@genome.icmb.relarn.ru.

С помощью введения гена каталитического компонента теломеразы (hTERT) был получен ряд культур импортированных клеток человека. Эти культуры включают в себя кожные фибробласты, мезенхимные стромальные клетки костного мозга и жировой ткани, стромальные клетки из трепаната губчатой кости, клетки волосяного сосочка и нейральные стволовые клетки. Источником клеток служили ткани взрослого человека, за исключением нейральных стволовых клеток, полученных из фетального материала. Все исходные клетки обладали ограниченной способностью к пролиферации, а после трансфекции приобретали способность к неограниченному росту. Эксперименты с непрерывным культивированием продолжались от полугода до двух лет. После преодоления предела Хейфлика не наблюдали тенденций к замедлению или ускорению роста культур. Для ряда культур были показаны появление в клетках теломеразной активности, удлинение теломер, локализация теломеразного белка, сохранение диплоидного кариотипа, сохранение способности переходить в состояние пролиферативного покоя и подверженность клеток контактному торможению пролиферации. Иммутизированные клетки сохраняли способности к дифференцировкам, присущие исход-

ным клеткам. Иммутизированные нейральные клетки были способны образовывать типичные нейросферы. Таким образом, по всем изученным признакам теломеризованные клетки не отличались от исходных. При изучении эффективности колониеобразования теломеризованных клеток выяснилось, что это свойство не возрастает после теломеризации. Были подобраны оптимальные условия колониеобразования фибробластов, позволяющие увеличить долю делящихся при разреженном посеве клеток до цифр, характерных для массовой культуры. Таким образом, с помощью теломеризованных клеток было показано, что гетерогенность пролиферативного потенциала фибробластов, определяемая с помощью клонирования отдельных клеток, во многом отражает несовершенство технологии клонирования, а не является внутренним свойством клеток. При оптимизации условий клонирования было показано, что одним из главных условий, способствующих пролиферации одиночных клеток, является снижение парциального давления кислорода. В условиях сниженного кислорода были получены бессмертные теломеризованные клетки, которые при переносе в условия атмосферного кислорода быстро ограничивали свою пролиферацию. Был проведен протеомный (MALDI-TOF) масс-спектрометрический анализ теломеризованных фибробластов. Обнаружены изменения в содержании 74 белков. Наиболее интересным изменением является повышение контроля за конформациями белков, что проявилось в увеличенном количестве различных шаперонов. Также в теломеризованных клетках изменена редокс-регуляция: снижено содержание супероксид-дисмутаза 1 и 2 и повышено содержание тиоредоксина и пероксиредоксина 6.

**ПРОСТРАНСТВЕННАЯ РЕОРГАНИЗАЦИЯ ГЕТЕРОХРОМАТИНА И ЕГО ТРАНСКРИПЦИОННАЯ АКТИВНОСТЬ В ИНДУЦИРОВАННЫХ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТЕВЛОВЫХ КЛЕТКАХ E-14 И IOUD2 МЫШИ.**  
© Н. И. Енукашвили,<sup>1</sup> И. С.-Р. Вайсертрейгер. <sup>1</sup> Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

В дифференцирующихся клетках организация гетерохроматина, структурной основой которого является сателлитная ДНК, претерпевает значительные структурные изменения. Целью данной работы было проследить изменения в пространственном положении, взаимодействии с некоторыми белками и транскрипционной активности центромерной (минорный сателлит, miSat) и прицентромерной (мажорный сателлит, maSat) сателлитной ДНК в мышинных эмбриональных стелловых клетках E-14 и IOUD2, индуцированных ретиноевой кислотой. Мы обнаружили, что miSat и maSat перемещаются в хромоцентры только на 4-е сут после индукции. Одновременно с этим происходили ассоциирование с белком HP1a и транскрипция прицентромерной (maSat), но не центромерной (miSat) ДНК. Количество транскрипта плавно увеличивалось и достигало максимума к 4-м сут после индукции. Обнаруженная РНК была полиаденилирована и транскрибировалась с лидирующей цепи. Транскрипты были использованы для получения кДНК. Методом флуоресцентной гибридизации *in situ* показано, что зонды, приготовленные из этой кДНК, гибридизовались с центромерами всех хромосом, т. е. транскрипт не является хромосом-специфичным. Также гибридизационный сигнал был обнаружен в межхромосомной нити, состоящей из позднотранскрибируемой сателлитной ДНК. Методом



РНК-ДНК FISH показано, что в дифференцирующихся стволовых клетках транскрипт локализован исключительно внутри хромоцентров. В культуре L929, полученной из мышинных фибробластов, транскрипт формировал 1—2 крупных кластера за пределами хромоцентров. Методами хроматин-иммунопреципитации и иммуноокраски показано, что в индуцированных клетках наблюдается взаимодействие *maCat* и белка РНК-хеликазы *p68* (регулятора транскрипции и вместе с тем участника сплайсинга), вовлеченного в процессы дифференцировки.

**ВОЗМОЖНОСТЬ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА НА МОДИФИЦИРОВАННЫХ КОЛЛАГЕН-ХИТОЗАНОВЫХ МАТРИЦАХ.** © А. В. Еремеев,<sup>1,2</sup> А. В. Светлаков,<sup>1,2</sup> И. Н. Большаков,<sup>2</sup> Ю. И. Шеина.<sup>1,3</sup> <sup>1</sup> Центр репродуктивной медицины, Красноярск, Россия, <sup>2</sup> Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого и <sup>3</sup> Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН, Москва.

Ранее была показана возможность модификации коллаген-хитозанового комплекса для создания адекватных условий дифференцировки ЭСК в кератиноциты. В этой связи было сделано предположение о том, что изменение состава матрицы путем добавления нейрональных морфогенов может способствовать дифференцировке культивируемых на них ЭСК в нейрональные дериваты. Также использование данных матриц должно, по нашему предположению, снижать риск образования тератом, поскольку известно, что микроокружение контролирует дифференцировку ЭСК в прогениторные клетки.

Таким образом видится перспективным создание матрицы не только для трансплантации, но и для дифференцировки и миграции плюрипотентных клеток. Целесообразно получить такую матрицу, при нанесении на которую эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) могли бы дифференцироваться в нейрональном направлении и данная конструкция была бы пригодна для трансплантации. Наличие такого сочетания очень важно, особенно для срочных трансплантаций, когда необходимо быстро восстановить утраченную нервную ткань и обеспечить качественную регенерацию. Мы предположили, что культивирование на коллаген-хитозановых матрицах ЭСК человека в кондиционированной эмбриональными нейрональными клетками мыши среде или при внесении в среду добавки N2 может приводить к нейрональной дифференцировке.

На сегодняшний день существуют различные протоколы получения дифференцированных дериватов нейрональных клеток из стволовых. Однако в этих протоколах для переноса клеток с культуральных флаконов используют растворы энзимов (трипсина, коллагеназы, диспазы и т. п.), что приводит к увеличению уровня апоптоза, клеточной гибели, повреждению поверхностных клеточных рецепторов. Возрастает вероятность контаминации, усложняется процедура трансплантации. В этой связи, использование матриц для культивирования и направленной дифференцировки элиминирует вышеописанные проблемы. Хотя в этом случае необходимость в дифференцировочных факторах все же остается. Вместе с этим использование рекомбинантных факторов роста и морфогенов при добавлении в матрицу значительно увеличивает ее стоимость, но также увеличивает вероятность им-

мунного ответа на чужеродный белок. Известно, что культивируемые клетки секретируют в среду различные факторы, поддерживающие пролиферативную активность или состояние дифференцировки клеток. Использование кондиционированной клетками среды в качестве добавки к матрице может помочь избежать вышеуказанных проблем и дать предпосылки для создания подложек для культивирования клеток разных типов, в том числе и стволовых. Для проверки этого предположения при культивировании на матрице ЭСК добавляли кондиционированную эмбриональными нейрональными клетками среду, которую меняли каждые 3-и сут. Было получено, что добавление в культуральную среду компонента N2 или кондиционированной среды приводило к нейрональной дифференцировке ЭСК человека. Оценивали возможность таких клеток дифференцироваться в нейрональном направлении.

Исследование морфологии клеток показало, что ЭСК после культивирования в вышеописанных условиях способны приобретать нейрональный фенотип. Дальнейшие исследования, доказывающие способность ЭСК дифференцироваться в данных условиях в нейрональные дериваты, были проведены с помощью иммуноцитохимии. Первоначально была исследована динамика экспрессии одного из нейрональных маркеров — нейрофиламента. Было получено, что на 1-е сут в обоих случаях отсутствуют сигналы флуоресценции по данному маркеру. На 5-е сут наблюдалось появление экспрессии нейрофиламента при культивировании ЭСК в кондиционированной эмбриональными нейрональными клетками среде, а на 7-е сут — и в клетках, культивируемых в среде с добавлением компонента N2.

Таким образом, было получено, что как и при культивировании на матрицах в кондиционированной эмбриональными нейрональными клетками среде, так и в среде с добавлением компонента N2 ЭСК на 14-е сут экспрессируют маркеры, характерные для нейрональных клеток и приобретают их морфологию.

**ВЛИЯНИЕ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ДНК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА (вкДНК) НА ДЛИТЕЛЬНОЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЖИРОВОЙ ТКАНИ.** © Л. В. Ефремова,<sup>1</sup> М. С. Конькова,<sup>1</sup> А. В. Ермаков,<sup>1</sup> С. В. Костюк,<sup>1</sup> Т. Д. Смирнова,<sup>1</sup> Л. В. Каменева,<sup>1</sup> Л. Н. Любченко,<sup>2</sup> Н. Н. Вейко.<sup>1</sup> <sup>1</sup> ГУ Медико-генетический научный центр РАМН, le2003@list.ru, и <sup>2</sup> Российский онкологический научный центр им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва.

Дифференцировка стволовых клеток представляет собой сложный процесс, молекулярные механизмы которого до сих пор до конца неясны. Существенную роль в этом процессе играет микроокружение клеток. Исследование влияния вкДНК на дифференцировку стволовых клеток представляет научный и практический интерес. Состав вкДНК значительно изменен по сравнению с составом ДНК, функционирующей в клетке. В вкДНК здоровых людей, особенно при патологии, увеличивается содержание CpG-богатых последовательностей генома (CpG—DNA) и снижается содержание AT-богатых. Маркером накопления CpG—DNA ранее предложено использовать транскрибируемую область рибосомного повтора (ТОРДНК). Увеличение в крови концентрации циркулирующих фрагментов CpG—DNA приводит к взаимодействию с рецепторами, которые экспрессируются на повер-



хности разных типов клеток организма, например с белками известного семейства toll-like рецепторов (TLR9).

Целью данного исследования был анализ влияния вкДНК человека, модельных CpG—DNA (фрагмент ТОрДНК) и AT—ДНК (фрагмент сателлита III, СатIII) и классического лиганда для TLR9 (ДНК *E. coli*) на физиологию мезенхимных стволовых клеток жировой ткани (МСК). Нами было показано, что добавление вкДНК, ТОрДНК и ДНК *E. coli* (1—100 нг/мл) в среду культивирования МСК стимулирует увеличение количества РНК в 2—6 раз. Количество мРНК TLR9 возрастает в 2.5—5 раз, наиболее сильный стимулятор экспрессии — фрагмент ТОрДНК. При длительном культивировании наблюдали активную дифференцировку МСК в адипоциты в присутствии ДНК *E. coli* или стандартного индуктора (StemCell Technologies, Канада). ВкДНК и ТОрДНК снижали скорость дифференцировки по сравнению с контролем и фрагментами СатIII. Несмотря на продукцию жира, дифференцированные в присутствии вкДНК клетки по морфологии кардинально отличались от адипоцитов. Через 3 нед культивирования плотность клеток в присутствии вкДНК и ТОрДНК была на 30—50 % выше, чем в контроле. Проведенные нами исследования *in vitro* показали, что фрагменты ДНК человека с различной последовательностью влияют на физиологию культивируемых МСК человека и на скорость их дифференцировки. Таким образом, при введении МСК в организм с целью терапии целесообразно провести анализ свойств вкДНК плазмы крови больного и определить *in vitro* ее возможное действие на вводимые клетки.

**ВЛИЯНИЕ СИНТЕТИЧЕСКОГО ПОЛИКАТИОНА НА СВОЙСТВА ФИБРОБЛАСТОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ.**  
© В. П. Иванова,<sup>1</sup> Л. Л. Алексеенко,<sup>2</sup> И. В. Арцыбашева,<sup>2</sup> Т. М. Гринчук.<sup>2</sup> <sup>1</sup> Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН и <sup>2</sup> Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Полимерные биоматериалы широко используются в медицинской практике не только в качестве имплантатов, но и как средство направленной транспортировки лекарственных препаратов к месту повреждения. Материалы, способствующие регенерации тканей, включая кожу, кровеносные сосуды и т. п., должны обладать, с одной стороны, механической стабильностью, чтобы поддерживать структуру ткани, с другой — обеспечивать прочное механическое связывание клеток на начальном этапе их взаимодействия с искусственной поверхностью. Одним из существенных аспектов тканевого моделирования является обеспечение контролируемого процесса клеточной адгезии. Очевидно, что степень клеточного прикрепления зависит как от типа клеток, так и от физико-химических свойств поверхности прикрепления. Основная задача при создании синтетических материалов сводится, таким образом, к усилению клеточных взаимодействий с искусственными носителями, которые могут использоваться не только в виде подложки, но и в капсулированной форме при направленной доставке определенных клеток к месту повреждения тканей. Не менее важным направлением является изучение влияния экзогенных растворимых факторов, включая и полимерные гидрофильные соединения, на адгезионные свойства клеток, которые могут быть использованы в перспективе в качестве биоматериала для ускорения регенеративных процессов.

Цель работы заключалась в исследовании влияния синтетического поликатиона полиаллиламина на адгезию фибробластов китайского хомячка линии CHL V-79 RJK с разной степенью устойчивости к температуре (40 °C), а также степень прикрепления указанных клеток к поликатиону, иммобилизованному на пластике. Клетки (10<sup>6</sup>/мл) инкубировали в 96-луночных платах, обработанных или не обработанных полимером. Во втором случае клетки преинкубировали с полимером в концентрации от 0.01 до 100 мкг/мл или без него 30 мин при 37 °C, после чего переносили суспензию в планшет и выдерживали 1 ч в тех же условиях. Прикрепившиеся клетки окрашивали кристаллическим фиолетовым. Иммобилизацию полимера проводили в концентрациях 10, 20 и 50 мкг/мл в течение 18 ч при 4 °C, после чего в лунки планшета вносили клеточную суспензию и проводили постановку реакции, как описано выше. Цитотоксичность действия полимера оценивали по выживаемости клеток, которую определяли с помощью МТТ-теста.

Показано, что степень прикрепления фибробластов к иммобилизованному на пластике полимеру зависела от концентрации препарата. При наименьшей из использованных концентраций полимер усиливал прикрепление клеток как терморезистентной, так и чувствительной к температуре клеточных линий по сравнению с адгезией этих клеток к пластиковой поверхности, не обработанной полимером. Увеличение дозы полимера, использованной для его иммобилизации, приводило к дозозависимому ингибированию адгезии обеих исследованных линий. Установлено также, что после предварительной обработки фибробластов обеих линий полимером в дозе 100 мкг/мл количество прикрепившихся клеток к пластику существенно сокращалось. В отличие от терморезистентной линии клеток, способность к прикреплению которых после обработки полимером при меньших дозах практически не отличалась от контрольных клеток, адгезивные свойства клеток чувствительной к температуре линии частично ингибировались под действием поликатиона, даже при наименьшей из исследованных концентраций препарата. Показано, что подавление клеточной адгезии после обработки клеток обеих линий полимером в концентрации 100 мкг/мл сопровождается снижением числа жизнеспособных клеток, вместе с тем частота встречаемости полиплоидных клеток в обоих клеточных вариантах существенно не менялась. В меньших дозах полимер практически не оказывал цитотоксического действия на фибробласты изученных линий. Таким образом, эффект снижения адгезии фибробластов чувствительной к температуре линии при воздействии на них полимером (в концентрации от 0.01 до 10 мкг/мл) не связан с подавлением жизнеспособности клеток, а скорее всего обусловлен мембранотропной активностью препарата.

Выявленная способность полимера активировать или ингибировать клеточную адгезию в зависимости от способа воздействия (в растворе или на твердой поверхности) и применяемой дозы позволяет рассматривать исследованный поликатион не только в качестве возможного биоадгезивного материала, но и как перспективный препарат с противоопухолевой активностью.

**ПРОМОТОР БЕЛКА ТЕПЛООВОГО ШОКА ДРОЗОФИЛЫ КАК РЕГУЛЯТОР АКТИВНОСТИ ТРАНСФИЦИРОВАННЫХ ГЕНОВ СТЕВЛОВЫХ КЛЕТОК МЛЕКО-**

ПИТАЮЩИХ. © Н. И. Канайкина, А. В. Ревин, Г. В. Павлова. Институт биологии гена РАН, Москва.

Нейродегенеративные заболевания (паркинсонизм, болезнь Альцгеймера, макулодистрофия сетчатки и др.), а также ишемический инсульт имеют огромное социальное значение, так как во многих случаях это одна из основных причин инвалидности и смертности людей трудоспособного и пожилого возраста. Традиционная медикаментозная терапия нейродегенеративных заболеваний дает несомненное улучшение качества жизни, однако в большинстве случаев проводимое лечение не влияет на течение болезни и не предотвращает дальнейшую гибель нейронов. Целый ряд проблем, возникающих при нейродегенеративных заболеваниях, может быть решен путем трансплантации здоровых клеток в область поражения. Ранее показано, что трансплантация собственных стволовых клеток (СК) в область поражения является одним из возможных лечебных воздействий при нейродегенеративных заболеваниях. Важным аспектом является проблема приживляемости и направленной дифференцировки СК после их трансплантации в мозг, а также обеспечение управления пролиферацией и дифференцировкой СК в культуре. Один из возможных путей усиления приживляемости и дифференцировки пересаженных клеток состоит в воздействии на ткани нейротрофических факторов, таких как GDNF. Особый интерес представляет использование СК как носителей GDNF для управления нейральной дифференцировкой не только трансплантируемых клеток, но и клеток-предшественников в тканях пациента. Конструкция, полученная на базе вектора EGFP-N 1 и содержащая гены белков GDNF и GFP, была введена в эмбриональные клетки линии HEK 293. С помощью Western- и Нозерн-блот-гибридизации, а также иммуногистохимической техники было показано активное функционирование обоих генов. В контрольных опытах в HEK-клетки вводили только ген зеленого белка. Оба типа клеток трансплантировали в головной мозг мышам. В случае трансплантации «контрольных» клеток наблюдалось формирование обширного рубца вокруг трансплантата, выявляемого иммуногистохимическими реакциями как на фибронектин, так и на кислый глиальный фибриллярный белок. Однако трансплантацией «опытного» материала образование рубцовой ткани практически блокировалось. Не следует забывать о контроле за активностью трансгена. Необходимо уметь регулировать «включение» и «выключение» нововведенного гена с целью снижения опасности для пациента. Мы предлагаем для использования промотор гена белка теплового шока hsp70, который при повышении температуры до 39 °C активирует ген, а затем выключает его до следующего хит-шокового температурного воздействия. Проведены эксперименты по проверке возможного управления функционированием чужеродных генов, введенных в СК млекопитающих, с помощью промотора теплового шока дрозофилы. На примере активации гена синего белка показана такая возможность. Была создана модельная система для изучения СК, трансфицированных генами человека, и цветных (синего и красного) белков под контролем хит-шокового промотора дрозофилы. На этой модельной системе изучали возможность эффективного взаимодействия генома СК человека и млекопитающих с контролирующими элементами дрозофилы.

ВКЛАД ТЕТРАПЛОИДНЫХ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТЕБЛОВЫХ КЛЕТОК (ЛИНИЯ D3T) В ОРГАНЫ И ТКАНИ ХИМЕРНЫХ МЫШЕЙ. © Е. А. Кизилова, Н. М. Матвеева, А. Н. Голубица, А. И. Железова, Н. С. Назарко, Е. А. Башева, О. Л. Серов. Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск.

Одно из важнейших свойств эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) — их способность к самообновлению популяции *in vitro* при сохранении стабильного диплоидного кариотипа и высокого плюрипотентного статуса. Однако до сих пор малопонятно, насколько важной является именно пloidность ЭСК для сохранения их плюрипотентности *in vivo*. Так, недавно была показана принципиальная возможность создания химерных мышей с использованием околотетраплоидных гибридных ЭСК, полученных в результате слияния диплоидных ЭСК и диплоидных соматических клеток. Целью данной работы был анализ плюрипотентности *in vivo* гибридной линии ЭСК мыши (D3T), полученной слиянием двух диплоидных линий ЭСК (tg2a и GFP-маркированная линия E14Tg2aSc4TP6.3). Линия D3T имеет устойчивый тетраплоидный кариотип и демонстрирует *in vitro* экспрессию маркеров плюрипотентности. Данная модель позволяет полностью исключить эффект, обусловленный разными генотипами партнеров по слиянию (поскольку обе исходные линии ЭСК получены из эмбрионов инбредных мышей линии 129/Ola), а также возможное эпигенетическое влияние партнеров по слиянию, которые находятся на разных стадиях цитодифференцировки (поскольку обе линии — это ЭСК). Таким образом, создаются неплохие условия для прямой экспериментальной проверки возможного влияния двукратного увеличения пloidности ЭСК на плюрипотентность *in vivo*. В нашей работе в трех одновременных экспериментах использовали два независимых отводка линии D3T (D3T-14 и D3T-7). Химер получали инъекцией ЭСК в бластоцисту мышей линии C57Black/6J. Было трансплантировано 245 бластоцист с клетками D3T-14 и 414 бластоцист с клетками D3T-14. Химер определяли на 28—30 *dpc* (по контрастным пятнам шерсти), а также *in utero* на сроках 12 *dpc* и 17—19 *dpc* (по специфическому GFP-свечению в тканях эмбрионов/плодов). К 12 *dpc* выход химер составил 19 % (4 эмбриона) для D3T-14 и 44 % (16 эмбрионов) для D3T-7. На 17—19 *dpc* выход химер составил 43 % (9 плодов) и 33 % (9 плодов) соответственно. В эксперименте, который завершился нормальными родами и вскармливанием, выход химер составил 44 % (11 особей) и 24 % (7 особей) соответственно. Существенных различий по выходу химер между отводками не наблюдалось. Вклад потомков тетраплоидных ЭСК, визуально оцененный по размерам контрастных пятен шерсти, варьировал от 5 до 80 %. Общее развитие, вес и фертильность у химер из группы D3T-14 в целом были сопоставимы с таковыми у мышей исходных линий. Несколько химер, полученных с использованием клеток D3T-7, значительно отставали в росте, имели диспропорции скелета обоих поясов конечностей и выраженную полидактилию. Гистологический анализ образцов 23 органов химерных животных показал, что потомки D3T дают вклад преимущественно в производные мезодермы и эктодермы. Заселение сперматогенного эпителия в нормально сформированных семенниках химеры из группы D3T-7 можно также интерпретировать как факт сохранения *in vivo* высокого плюрипотентного статуса клеток тетраплоидных ЭСК. Гистологический анализ по-



казал присутствие потомков линии D3T как в строме, так и в генеративной части эмбриональных гонад у 18 химерных плодов обоего пола. Однако при визуализации белков синаптомембранного комплекса на распластанных препаратах ооцитов наблюдали нормально развивающиеся ядра только диплоидных ооцитов на стадии пахитены. Анализ синаптомембранных комплексов в гаметогенезе химер-самцов предполагается выполнить после достижения ими возраста репродуктивной зрелости.

Таким образом, предпринятые нами эксперименты с использованием гибридной тетраплоидной линии ЭСК D3T позволяют заключить, что увеличение пloidности (до 4n) не влияет на плюрипотентность этой линии *in vivo*. В естественном гуморальном и тканевом окружении, которое предоставляет собой развивающийся нормальный диплоидный организм, можно наблюдать весьма существенный вклад потомков этой тетраплоидной ЭСК в разные органы и ткани, включая и генеративные.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 09-04-01369а) и компании Carl Zeiss.

**ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ, СОПРОВОЖДАЮЩИЕ ИНДУКЦИЮ ПЛЮРИПОТЕНТНОГО СОСТОЯНИЯ В КЛЕТКАХ ЭНДОТЕЛИЯ ЧЕЛОВЕКА.**  
© С. Л. Киселев, М. А. Лагарькова, М. В. Шутова, А. Н. Богомазова, Е. Васина, И. В. Честков. Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва. SI\_kiselev@yahoo.com, kiselev@vigg.ru.

Транскрипционные факторы играют ключевую роль во всех процессах как в соматических, так и в плюрипотентных клетках. Последние исследования показали, что функциональная активность транскрипционных факторов раннего эмбрионального развития млекопитающих выше, чем транскрипционных факторов дифференцированных клеток. Соматические клетки, в которых оказывался повышенный уровень экспрессии транскрипционных факторов, характерных для плюрипотентных клеток, легко переходили в состояние, по своим морфологическим и функциональным свойствам напоминавшее эмбриональные стволовые клетки. К сегодняшнему дню клетки с индуцированной плюрипотентностью (iPS) получены из фибробластов, кератиноцитов, гемопоэтических, нейрональных и других типов клеток.

Нами впервые были получены и охарактеризованы линии iPS клеток из эндотелиальных клеток пупочной вены человека. Полученные линии были охарактеризованы на экспрессию маркеров плюрипотентного состояния, целостность генома и способность дифференцироваться в клетки трех зародышевых листков. Было проведено изучение статуса метилирования промоторных районов 14 000 генов методом высокопроизводительного скрининга. Оказалось, что индукция плюрипотентного состояния в эндотелиальных клетках человека приводит к радикальному изменению статуса метилирования. Одновременно с изменением метилирования ДНК происходят значительные изменения в структуре хроматина соматических клеток, затрагивающие механизмы инактивации X-хромосомы. Полученные нами результаты указывают на глобальные эпигенетические изменения, происходящие во время индукции плюрипотентного состояния в отдельных соматических клетках человека.

**ИНГИБИРОВАНИЕ *n*-НИТРОФЕНИЛ- $\beta$ -D-КСИЛОПИРАНОЗИДОМ СИНТЕЗА ПРОТЕОГЛИКАНОВ В МИОБЛАСТАХ КРЫСЫ L6J1 ПОДАВЛЯЕТ РОСТ И УСКОРЯЕТ ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ ЭТИХ КЛЕТОК.**  
© М. С. Климова,<sup>1</sup> И. И. Ермакова,<sup>1</sup> А. А. Кульминская,<sup>2</sup> Д. Р. Иванен,<sup>2</sup> Г. А. Сакута,<sup>1</sup> В. И. Морозов.<sup>1</sup> <sup>1</sup> Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург и <sup>2</sup> Петербургский институт ядерной физики РАН им. Б. П. Константинова, Гатчина.

Протеогликаны (ПГ) являются важными компонентами внеклеточного матрикса (ВКМ) не только как элемент структуры, но и как модуляторы активности различных регуляторных молекул (Ермакова и др., 2007, 2008). Интересные возможности изучения роли ПГ в регуляции поведения клеток предоставляют ингибиторы синтеза ПГ ксилопиранозиды, в частности *n*-нитрофенил- $\beta$ -D-ксилопиранозид (ПНФ  $\beta$ -ксилозид). Попадая в клетку, эти соединения служат затравкой для синтеза цепей гликозаминогликанов, которые остаются в свободном, не связанном с коровым белком состоянии и выводятся из клетки. Цель данной работы состояла в изучении влияния ПНФ  $\beta$ -ксилозида на рост и дифференцировку миобластов крысы L6J1. При проведении опыта в ячейки 24-луночного планшета высевали по  $10^4$  миобластов L6J1, прошедших 5—7-й пассажи, в среде DMEM, дополненной 10 % эмбриональной бычьей сыворотки. По прошествии 1 сут культуральную среду заменяли на такую же среду, содержащую 0,1, 1 и 5 мМ ПНФ  $\beta$ -ксилозида. Наблюдение за ростом клеток вели в течение 3—7 сут. Было показано, что рост миобластов в присутствии ПНФ  $\beta$ -ксилозида происходил достоверно медленнее, что сочеталось с достоверно более высоким количеством образующихся миотуб ( $P < 0.05$ ), причем этот эффект усиливался при увеличении концентрации ксилозида от 0,1 до 5 мМ. Таким образом, ингибирование синтеза ПГ миобластами под действием ПНФ  $\beta$ -ксилозида усиливает дифференцировку миобластов, очевидно в результате подавления их пролиферации.

**ПЕРСПЕКТИВЫ И ПРОБЛЕМЫ ПРИМЕНЕНИЯ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК (МСК) В КАЧЕСТВЕ СРЕДСТВА ИММУНОДЕПРЕССИВНОЙ ТЕРАПИИ.**  
© В. Б. Климович. Российский научный центр радиологии и хирургических технологий Росмедтехнологий, Санкт-Петербург.

В настоящее время исследования МСК сосредоточены на применении их в качестве средства восстановительной терапии при травмах, патологии опорно-двигательного аппарата, неврологических, сердечно-сосудистых и некоторых других заболеваниях. Анализ публикаций последних 10 лет приводит к выводу о наличии у МСК также свойств иммунодепрессивных агентов (Клеточная трансплантация и тканевая инженерия, 2006, № 3(5), с. 36; Trends in Immunol., 2007, vol. 28, p. 219). В опытах на животных показано, что пересадка МСК реципиентам аллогенных тканей может увеличивать время жизни трансплантатов и тормозить развитие реакции «трансплантат против хозяина». Установлено также, что МСК подавляют дифференцировку и пролиферацию культивируемых Т- и В-лимфоцитов, естественных киллеров и дендритных клеток человека. При пересадке органов и тканей пациентам назначают иммунодепрессивную тера-



пию, что создает опасность инфекционных и онкологических осложнений, тогда как минимизация иммунодепрессии чревата проявлениями реакций несовместимости. Это диктует потребность в разработке новых подходов к контролю активности иммунокомпетентных клеток донора и реципиента. Предполагается, что МСК могут быть полезны при профилактике отторжения трансплантатов, болезни «трансплантат против хозяина», при лечении аллергических и аутоиммунных заболеваний. Это может открыть принципиально новые возможности в трансплантологии и в сфере применения МСК. Мировой опыт применения МСК в качестве иммунодепрессоров при пересадках органов пока крайне ограничен. У нескольких пациентов с пересаженными органами (почка, печень) пересадка костного мозга позволила отказаться от применения химических препаратов-иммунодепрессантов. В ходе клинических испытаний, проведенных в РНЦ РХТ, было обнаружено благоприятное влияние МСК, введенных кардиологическим больным, на течение аллергических заболеваний (Патент № 2250773, 27.04.2005).

Многие аспекты применения МСК требуют дальнейших углубленных экспериментальных исследований и клинических наблюдений. До недавнего времени основными источниками МСК считали костный мозг и пуповинную кровь. В течение последних 6—7 лет интенсивно изучают свойства и возможности применения МСК, происходящих из стромы жировой ткани. Использование этого источника МСК имеет целый ряд преимуществ. Процедура получения жировой ткани наряду с малой инвазивностью и минимальным риском осложнений позволяет получать большой объем исходного материала. Технология выделения фракции стромальных элементов легко воспроизводима. Полученные клетки функционально и фенотипически подобны МСК из костного мозга. Они обладают таким же дифференцировочным потенциалом, высокой пролиферативной активностью, отличаются меньшей зависимостью от состава питательной среды. Возможно, в будущем именно жировая ткань станет основным источником МСК для клинического применения.

Другие нерешенные проблемы, связанные с перспективами клинического применения МСК, состоят в том, что пока не определены оптимальные режимы культивирования МСК и протоколы введения их пациентам. Нет сведений о глубине и стойкости иммунодепрессивных эффектов МСК, о совместимости цитотерапии МСК с применяемыми в клинике методами лекарственной иммунодепрессии, о спектре и характере возможных осложнений. Актуальна также разработка модельных систем и биологических тестов, позволяющих прогнозировать и адекватно оценивать иммунодепрессивную активность трансплантируемых МСК.

**МАР-КИНАЗА p38 В РЕГУЛЯЦИИ АПОПТОЗА КЛЕТОК ЭПИДЕРМОИДНОЙ КАРЦИНОМЫ A431 ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ЭПИДЕРМАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА** © П. Ю. Козюлина, П. С. Грудинкин, В. В. Зенин, Н. Н. Никольский. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Клетки эпидермоидной карциномы человека A431 характеризуются повышенной экспрессией рецептора эпидермального фактора роста (EGF) и подвергаются апоптозу и остановке клеточного цикла при действии EGF в высоких (нанолярных) концентрациях. Для реализации

этих ответов необходимы рецептор EGF, тирозинкиназы семейства Src и транскрипционный фактор STAT1.

В настоящей работе была исследована роль МАР-киназы p38 в реализации EGF-зависимых эффектов в клетках A431. При воздействии EGF на фоне блокирования p38 ингибитором SB203580 уменьшение суммарной активности митохондрий, оцениваемое методом МТТ, было выражено слабее, причем степень ослабления эффекта EGF зависела от концентрации ингибитора и EGF. В присутствии 5 мкМ SB203580 EGF вызывал стабилизацию количества клеток. Блокирование EGF-индуцируемого апоптоза при действии SB203580 было продемонстрировано методами выявления апоптотической фрагментации ядер и иммуноблота антителами против активной (расщепленной) каспазы 3. Клетки при воздействии EGF на фоне SB203580 не округлялись, а уплощались с уменьшением количества межклеточных контактов и появлением отростков. Проточная цитофлуориметрия с использованием окраски ДНК иодидом пропидия и метода разбавления красителя показала, что SB203580 не препятствовал EGF-индуцируемому блоку клеточного цикла в фазах G<sub>2</sub> и G<sub>1</sub>. Таким образом, МАР-киназа p38 может быть вовлечена в передачу сигнала от EGF на апоптоз, но не на блок клеточного цикла.

Активация МАР-киназы p38 была продемонстрирована при различных временах воздействия EGF методом иммуноблота. Ингибирование p38 приводило к усилению фосфорилирования МАР-киназы ERK и к ослаблению фосфорилирования самой p38, а также к ослаблению фосфорилирования по тирозину рецептора EGF и STAT1. Накопление STAT1 на уровне белка, обычно зависимое от транскрипционной активности самого STAT1, также было менее выражено в присутствии SB203580. Таким образом, проапоптотическое действие МАР-киназы p38 может быть, по крайней мере частично, объяснено усилением активации STAT1. С другой стороны, EGF-индуцируемое накопление ингибитора клеточного цикла p21<sup>waf1</sup> не зависело от активности МАР-киназы p38.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 08-04-01186-а) и Федеральной программы «Молекулярная клеточная биология».

**ЭМБРИОНАЛЬНЫЕ СТЕВЛОВЫЕ КЛЕТКИ ЧЕЛОВЕКА.** © А. М. Кольцова, Т. А. Крылова, В. В. Зенин, А. С. Мусорина, Т. К. Яковлева, Г. Г. Полянская. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Эмбриональные стеловые клетки (ЭСК), выделенные из ранних эмбрионов млекопитающих, включая человека, являются носителями информации развития всего организма в онтогенезе. ЭСК, с одной стороны, обладают способностью к неограниченной пролиферации, а с другой — являются плюрипотентными. Благодаря наличию этих уникальных свойств популяции ЭСК широко используются для фундаментальных исследований в разных областях клеточной и молекулярной биологии, а также для прикладных исследований, к которым относятся медицинская трансплантология, лекарственное и тератогенное тестирование. Каждая вновь полученная линия ЭСК является уникальной, имеющей свои свойства, определяемые ее геномом. В то же время любая постоянная линия ЭСК должна отвечать определенному набору характери-

стик, доказывающих ее способность к неограниченной пролиферации и сохранению плюрипотентности. В настоящей работе представлены результаты по выделению и характеристике ЭСК человека. Для получения ЭСК из предимплантационных бластоцист были использованы метод механического выделения внутренней клеточной массы и последующее ее культивирование на слое фидерных клеток, в качестве которых были использованы митотически инактивированные митомидином-С мезенхимные клетки эмбриона человека, выделенные нами ранее. Из двух бластоцист были выделены активно пролиферирующие ЭСК. С помощью гистохимического анализа показана высокая активность щелочной фосфатазы. К настоящему времени из ЭСК одной бластоцисты получена постоянная клеточная линия (SC5), прошедшая более 100 удвоений клеточной популяции, что значительно превышает лимит Хейфлика. Время удвоения оценивали, производя ежедневные измерения площадей 10 колоний с помощью компьютерной программы WCIF imageJ, и оно равно  $29.0 \pm 2.1$  ч. ЭСК из 2-й бластоцисты к настоящему моменту находятся в процессе культивирования и пока не преодолели лимит Хейфлика. С помощью кариологического и иммунофлуоресцентного анализа полученная клеточная линия охарактеризована по ряду свойств, подтверждающих статус постоянной линии ЭСК человека. Клетки сохраняют стабильную пролиферативную активность, имеют в кариотипе 46 нормальных хромосом человека (XX). Эта линия характеризуется экспрессией транскрипционных факторов OCT-4 и NANOG, что подтверждает статус линий ЭСК разного видового происхождения, а наличие экспрессии поверхностных антигенов (SSEA-4 и TRA-1-60) подтверждает статус ЭСК именно человека. Результаты иммунофлуоресцентного анализа экспрессии антигенов, характеризующих производные эктодермы, эндодермы и мезодермы, подтвердили наличие плюрипотентности в этой линии ЭСК. Исследование распределения клеток этой линии по фазам клеточного цикла методом проточной цитофлуориметрии показало его сходство с другими клеточными линиями. Показано наличие в недифференцированных ЭСК человека экспрессии Р-гликопротеина, АТФ-связывающего ABCG2-транспортера, который, по-видимому, является одним из механизмов защиты ЭСК от повреждений. Примембранная окраска моноклональными антителами против ABCG2 транспортера обнаружена не во всех клетках колоний, что связано, по-видимому, с неоднородностью исследуемых клеточных популяций ЭСК.

**ПРОЛИФЕРАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В ТКАНЯХ ПЛАНАРИЙ *GIRARDIA TIGRINA* ПРИ РЕГЕНЕРАЦИИ ГЛОТКИ И ГОЛОВНОГО КОНЦА ТЕЛА.** © Крейценко Н. Д. Институт биофизики клетки РАН, Пушкино, Московская обл., nkreshch@rambler.ru.

Планарии являются представителями беспозвоночных животных (тип Platyhelminthes, класс Turbellaria), характеризующихся высоким регенерационным потенциалом. Планарии обладают особым типом тотипотентных стволовых клеток — необластов, аналогов стволовых клеток позвоночных животных. Эти клетки служат источником для восстановления утраченных тканей, органов и частей тела после повреждения, ампутации или в ходе бесполого размножения, а также составляют основу для постоянного клеточного самообновления организма.

Стволовые клетки делятся и образуют на раневой поверхности скопление, регенерационную бластему, где они дифференцируются в специализированные клетки тела (нервные, мышечные, кишечные, паренхимные и др.). Механизмы регуляции составляющих компонентов регенерационного процесса у планарий остаются неизвестными.

Пролиферативную активность изучали в ходе регенерации головного ганглия и глотки у планарий бесполой лабораторной расы *Girardia tigrina*. Суспензию клеток окрашивали прижизненным флуоресцентным красителем Hoechst 33342. Для аккумуляции митотических картин использовали колхицин. Под флуоресцентным микроскопом подсчитывали число митозов и определяли митотический индекс (MI) в предглоточной, окологлоточной и хвостовой областях тела у интактных планарий через 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72 и 96 ч с момента удаления глотки; через 2, 4, 8, 12, 24 и 48 ч после отсечения головного конца тела вместе с церебральным ганглием. Изучали влияние нейропептидов (NPF, FMRF, GYIRF и HNA) на пролиферативную активность. С помощью иммуноцитохимических маркеров, специфичных для нервных и мышечных клеток, и лазерной сканирующей микроскопии наблюдали за дифференцировкой нервной системы и мускулатуры в ходе регенерации. Результаты показали, что у интактных планарий MI был одинаковым в разных областях тела (0.2—0.3). При регенерации глотки увеличение числа митозов наблюдали в окологлоточной области через 2 (0.6) и 24 (0.7) ч, а также на 3-и сут. В предглоточной области MI достигал максимума к 12 ч регенерации (0.5), второй подъем MI наблюдали на 3-и и 4-е сут. Добавление морфогена гидры (HNA, 0.1 мкМ) вызывало изменение динамики пролиферативной активности и повышение значения MI в окологлоточной области и в предглоточной зоне тела планарий. После отсечения головного конца тела у планарий наблюдали постепенное увеличение MI в предглоточной области тела с максимальным его значением к 24 ч регенерации. Воздействие нейропептидом NPF (0.1 и 1 мкМ) увеличивало число митозов через 4, 12 и 24 ч регенерации. Значение MI у подопытных животных варьировало от 125 до 160 % от показателя у контрольных планарий. GYIRF и FMRF (0.01, 0.1 и 1 мкМ) не проявили митогенного действия через 24 ч регенерации. Итак, у планарий после удаления глотки и головного ганглия происходило увеличение пролиферативной активности стволовых клеток как в области регенерации, так и в областях, удаленных от места регенерации. Эти изменения носили волнообразный характер и происходили не одновременно в области регенерации и в области удаленной от места регенерации. Динамика пролиферативной активности указывала на то, что в поздние сроки регенерации (2—4 сут) использовались резервы стволовых клеток из более удаленных от места регенерации областей. Было обнаружено, что природные нейропептиды могут функционировать в качестве факторов, регулирующих морфогенетические процессы у планарий. Дифференцировка нервной системы и мускулатуры у регенерирующих планарий происходила в сжатые сроки, так что к 5—7-м сут новые глотка и головной ганглий нормально функционировали.

В свете значительного теоретического интереса к эмбриональным стволовым клеткам человека и других организмов и возможностью их практического применения в биологии и медицине исследования, проводимые у такого доступного и хорошо изученного модельного объекта, ка-



ким являются планарии, представляются особенно перспективными и позволяют получить новые сведения о древнейших стволовых клетках в животном царстве.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 07-04-00452а и 09-04-00243а).

**К ПРОБЛЕМЕ МОРФОГЕНЕЗА IN VITRO КЛЕТОК АНДРОКЛИННОГО КАЛЛУСА ПШЕНИЦЫ.** © Н. Н. Круглова. Учреждение РАН Институт биологии Уфимского НЦ РАН, Уфа, [Kruglova@anrb.ru](mailto:Kruglova@anrb.ru).

Морфогенез растений как совокупность протекающих в развивающемся организме процессов дифференциации клеток с образованием специализированных тканей и органов (Марченко, 1996) вызывает большой интерес с позиции стволовых клеток, несмотря на то что проблема существования стволовых клеток у растений остается открытой (Иванов, 2003; Батыгина и др., 2004; Батыгина, Рудский, 2006). Одно из перспективных направлений исследований в этой области — изучение в контролируемых условиях *in vitro* морфогенеза клеток андроклинного каллуса, образовавшегося в культивируемом пыльнике из одной гаплоидной клетки — микроспоры, реализующей в данном случае спорофитную программу развития на основе биологического феномена андроклинии (Эмбриологические основы андроклинии, 2005).

На примере коллекции сортов и гибридных линий яровой мягкой пшеницы методами световой и электронной микроскопии установлено, что андроклинные каллусы, появившиеся на поверхности пыльников, культивируемых *in vitro* на индукционной среде (по прописи: Murashige, Skoog, 1962), состоят из меристематических клеток. Методом иммуноферментного анализа растительных образцов (Кудоярова и др., 1986) в андроклинных каллусах выявили содержание эндогенного гормона — ауксина индолил-3-уксусной кислоты, затем перенесли их на регенерационную среду (по прописи: Blaydes, 1978) в вариантах, различающихся концентрацией экзогенного ауксина индолил-3-уксусной кислоты. Методами световой и электронной микроскопии выявлено, что по мере культивирования *in vitro* на регенерационной среде меристематические каллусные клетки развиваются по различным путям морфогенеза. Установлено, что в условиях выполненных экспериментов к дальнейшему формированию полноценных фертильных растений-регенерантов пшеницы ведут такие пути морфогенеза *in vitro* меристематических клеток андроклинного каллуса, как эмбриоидогенез (состоит в формировании в толще каллуса эмбриоида — зародышеподобной структуры) и гемморизогенез (состоит в формировании в толще каллуса почки и корня). Показано, что определяющую роль в индукции того или иного пути морфогенеза *in vitro* меристематических клеток играет баланс между эндогенным содержанием индолил-3-уксусной кислоты (внутренний сигнал) и концентрацией экзогенной индолил-3-уксусной кислоты (внешний сигнал). Есть все основания полагать, что меристематические клетки каллуса следует оценивать с позиции концепции компетентных клеток-мишеней, восприимчивых к действию внешнего сигнала. Чрезвычайно важен вопрос о том, какая именно меристематическая клетка андроклинного каллуса вступит на путь морфогенеза и даст начало либо эмбриоиду, либо тому или иному органу (почке, корню).

Определяющую роль в способности меристематической клетки к морфогенезу в системе андроклинного каллуса играют как расположение этой клетки в структуре каллуса (а именно в его толще), так и межклеточные взаимодействия в развивающемся каллусе, в соответствии с механизмами позиционного контроля морфогенеза. По-видимому, меристематические каллусные клетки, способные к развитию по определенному пути морфогенеза *in vitro* с формированием эмбриоидов или органов и далее растений-регенерантов, можно оценивать как стволовые. Однако эти меристематические клетки сами берут начало от одной клетки — микроспоры. Таким образом, полученные экспериментальные данные подтверждают ранее высказанное мнение Т. Б. Батыгиной и соавторов (2004, 2006) о микроспоре как о стволовой клетке.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 08-04-97045) и программы «Ведущие научные школы РФ» (проект НШ-2096.2008.4).

**НЕЙРАЛЬНЫЕ ПРЕДШЕСТВЕННИКИ ИЗ РЕТИНАЛЬНОГО ПИГМЕНТНОГО ЭПИТЕЛИЯ ГЛАЗА ВЗРОСЛОГО ЧЕЛОВЕКА.** © А. В. Кузнецова, Л. А. Милушина, А. С. Микаелян, М. А. Александрова. Учреждение РАН Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН, Москва.

При лечении нейродегенеративных заболеваний ЦНС большие надежды возлагаются на терапию с использованием стволовых и прогениторных клеток (СПК). В связи с этим проводится поиск возможных источников СПК, которые были бы уже коммитированы в направлении нейральной дифференцировки. Предполагается существование нескольких источников предшественников нейральных клеток у млекопитающих и человека, некоторые из которых располагаются в глазу. Так, клетки, обладающие свойствами стволовости, обнаружены в ретинальном пигментном эпителии (РПЭ). Поскольку РПЭ и клетки мозга имеют общее нейроэпителиальное происхождение, это делает РПЭ иммунологически привилегированным при трансплантации не только в глаз, но и в ЦНС. Целью исследования явилось изучение пролиферативной активности и дифференцировочного потенциала РПЭ взрослого человека в первичной культуре. Первичные культуры РПЭ были получены из аутопсийного материала, от доноров с неизвестным анамнезом. Первичную культуру выращивали на двух альтернативных средах, сывороточной и бессывороточной, в пластиковых флаконах площадью 25 см<sup>2</sup> и на поверхности вкладышей в 24-луночных платах для дальнейшей иммуноцитохимической (ИЦХ) оценки. Для определения пролиферативного потенциала клеток, получаемых из РПЭ, добивались получения монослойной культуры, используя среду с сывороткой. Бессывороточная среда с ростовыми факторами использовалась для получения сфер в суспензионной культуре. Для ИЦХ-характеристики культуры использовали Ki-67, nestin, vimentin, beta III tubulin, neurofilaments, GFAP, calbindin, Tyrosine hydroxylase, CRALB, Cx43, recoverin, Pax6, Oct4, Nanog и фибронектин. При ПЦР культур РПЭ исследовали транскрипционные факторы и маркеры дифференцировки Pax6, Oct4, Nanog, NS, beta III tubulin, Nestin, GFAP, GS, FoxC1, Pitx2, pigment epithelium-derived factor (PEDF), RPE65 и Recoverin. Клеточную суспензию получали ме-



ханическим отделением пластов пигментного эпителия от сосудистой оболочки заднего сектора глаза. Первыми прикреплялись и расплаывались крупные сильнопигментированные эпителиоподобные (ЭП) клетки, а через 1 нед. появлялись мало пигментированные клетки (фибробластоподобные клетки — ФП). В случаях сохранного РПЭ клетки прикреплялись и бурно пролиферировали, образуя уже через 2 нед. плотный монослой из слившихся мелких слабопигментированных ЭП-клеток с единичными сильнопигментированными крупными клетками. В случаях начала гибели РПЭ крупные сильнопигментированные ЭП-клетки в культуре были единичными, мелкие слабопигментированные клетки отсутствовали, а через 7 сут отмечалось разрастание колоний ФП-клеток. При ИЦХ в культурах с ЭП-колониями клетки экспрессировали Sx43, N-Cad, виментин и фибронектин. Культуры с ФП морфологией экспрессировали нестин, виментин, Pax6 и beta III tubulin, что свидетельствовало об их способности к нейральной дифференцировке. Проллиферативная активность в монослойной культуре была выше, чем в суспензионной, что подтверждено экспрессией Ki-67. При ИЦХ-окрашивании сфер в них отмечено преимущественное содержание нестин-позитивных клеток. При ПЦР РПЭ показано отсутствие экспрессии Pitx2, FoxC1 и Recoverin, наличие PEDF, RPE65, Oct4, Nanog, NS и Pax6. Причем в сферах отмечено резкое усиление экспрессии этих генов, особенно Nanog. Эти данные позволяют предполагать возможность дедифференцировки клеток при образовании сфероидных структур. Таким образом, в культуре клеток из РПЭ глаза взрослого человека выявляются черты нейральной дифференцировки.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 08-04-00081) и Федерального агентства по науке и инновациям (проект 02.512.12.2008).

**КОМПЕТЕНТНОСТЬ К ПАРТЕНОГЕНЕЗУ ООЦИТОВ КОРОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ФОЛЛИКУЛОВ РАЗНОГО ДИАМЕТРА.** © Т. И. Кузьмина, О. С. Скотти, Г. В. Мурза. Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных РАСХН, Санкт-Петербург—Пушкин, prof.kouzmina@mail.ru.

Партеногенез млекопитающих — информативная модель для решения ряда актуальных задач генетики развития и экспериментальной эмбриологии. У млекопитающих описан как спонтанный (Кузьмина, 1990), так и индуцированный партеногенез (Lagutina et al., 2004). Известны случаи рождения живого потомства у мышей (Tomohiro Kono et al., 2004). В настоящее время партеногенетические зародыши сельскохозяйственных животных на стадии бластоцисты получены у свиней, коров и лошадей (Yoshida et al., 1990; Carneiro et al., 2001; Somfai et al., 2006; Milazzotto et al., 2007). Жизнеспособность партеногенетических эмбрионов низкая. Выявление факторов, влияющих на потенции ооцита к партеногенезу, создаст возможность направленного получения гаплоидных или диплоидных зародышей. Нами исследована компетентность ооцитов коров, выделенных из фолликулов разного диаметра (d) (I группа — <3 мм, II группа — 3—5 мм, III группа — 5—8 мм), к индуцированному партеногенезу. Ооциты культивировали в среде TC-199 с 10 % фетальной бычьей сыворотки и 50 нг/мл бычьего пролак-

тина (Институт химии гормонов, Москва) совместно с клетками гранулезы ( $10^6$  кл./мл). Индукцию ооцитов к партеногенетическому развитию проводили холодовым шоком в течение 20 мин на стадии метафазы I через 18 ч после начала культивирования (Эрнст и др., Патент № 1086808, 1983). Отбор дробящихся зародышей проводили через 28 ч после активации, дальнейшее культивирование эмбрионов осуществляли в синтетической среде SOF (Sigma). Статус хроматина ооцитов и зародышей оценивали методом Тарковского (Tarkowsky, 1966). Всего процедуре активации подверглись 320 ооцитов. Через 48 ч после стимуляции ооцитов к партеногенезу доля дробящихся зародышей составила: в группе I — 14.5 % (12/83), в группе II — 39.8 (70/176), в группе III — 55.7 % (34/61). Наибольший процент дробящихся зародышей отмечен в группе ооцитов из фолликулов d от 5 до 8 мм. Выявлены достоверные различия в числе партеногенов на стадии 2—4 клеток между I и II, I и III группами ( $P < 0.001$ ). После культивирования в течение 7 сут в группе I не было обнаружено эмбрионов, продолживших развитие, в группе II 28.9 % (51/176) зародышей находились на пролонгированных стадиях развития (от 6—8-клеточных до поздних морул, в том числе 2 бластоцисты). В группе, где активации к партеногенезу подверглись ооциты из фолликулов d 5—8 мм, развитие продолжили 39.3 % (24/61), 2 эмбриона находилось на стадии бластоцисты. Не выявлено достоверных различий между всеми экспериментальными группами по числу эмбрионов, продолживших развитие после первого—второго дроблений. 43 партеногенетических зародыша и 78 зародышей, полученных после оплодотворения, на стадии 8—16 клеток были оценены по наличию в них бластомеров с апоптотными ядрами (TUNEL). Число партеногенетических зародышей с признаками апоптоза значительно превысило таковое в группе эмбрионов, развившихся из оплодотворившихся ооцитов: 72 % (31/43) против 27 % (21/78),  $P < 0.001$ .

**ПРИМЕНЕНИЕ АУТОЛОГИЧНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ПОЛОСТИ РТА ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ УВЕЛИЧЕНИЯ ОБЪЕМА МЯГКИХ ТКАНЕЙ ПАРДОНТА И УСТРАНЕНИЯ РЕЦЕССИЙ ДЕСНЫ.** © А. А. Кулаков, А. И. Грудянов, И. И. Степанова, В. Л. Зорин, А. И. Зорина. ФГУ «ЦНИИС и ЧЛХ Росмедтехнологий» и «Медико-биологические технологии», Москва.

Успехи современной эстетической стоматологии во многом определяются научной разработкой и внедрением в практику новых технологий, которые существенно меняют традиционные представления о возможностях лечения. С сентября 2006 г. на базе ФГУ «ЦНИИС и ЧЛХ Росмедтехнологий» совместно с ООО «Медико-биологическая компания» проведены ограниченные клинические исследования по применению аутологичных фибробластов слизистой оболочки рта человека для восстановления утраченных межзубных десневых сосочков и воссоздания достаточного объема десны.

В группу исследования вошли 20 пациентов-добровольцев, из них 16 женщин и 4 мужчин в возрасте от 20 до 45 лет без выраженной соматической патологии с наличием тонкого биотопа десны, рецессий десны I—IV класса по Миллеру, «черных треугольников», ретракции краевой десны после операции внутрикостной имплантации. Все-

го обследовано 120 зубов, из них 18 имплантатов из 102 зуба с рецессиями десны, возникшими после лечения хронического пародонтита. Перед забором биоптата все пациенты проходили стандартное клинико-лабораторное обследование, включающее в себя анализ крови на инфекции. Биопсию слизистой оболочки проводили со стороны преддверия полости рта, твердого неба или ретромолярного пространства, после чего материал поставляли в лабораторию для выделения и культивирования фибробластов. После получения необходимого количества клеток часть из них криоконсервировали для дальнейшего хранения и использования. Культивированные аутологичные фибробласты слизистой оболочки рта человека поставляли в клинику в медицинском термоконтейнере в стерильных пробирках. Клеточный материал вводили в собственно слизистую оболочку десны, прилежащую к шейке зуба, и (или) в межзубные десневые сосочки на глубину 1 мм в количестве  $2 \cdot 10^6$ — $5 \cdot 10^6$  клеток в 200—400 мкл. Для интерпретации полученных результатов применяли клинические визуальные, количественные и инструментальные методы исследования.

Полученные результаты позволяют сделать следующие выводы. 1. Забор исходного материала для последующего выращивания культуры аутофибробластов целесообразно проводить из области бугров верхней челюсти, неба или из преддверия полости рта. 2. Инфекционное введение аутофибробластов способствует увеличению субстрата мягких тканей в месте введения клеток и позволяет уменьшить или устранить рецессию десны, возникшую после проведения пародонтологического лечения и имплантологических вмешательств. 3. Клинические и функциональные изменения обусловлены не реактивным местным ответом на травму при введении суспензии, а влиянием введенной культуры аутофибробластов. Это подтверждено результатами оптической когерентной томографии: увеличением толщины десны через 2 нед на 200 мкм, через 2 мес — на 230 мкм, с 5-го по 9-й мес результат оказывался максимальным — 254 мкм. Кроме увеличения толщины слизистой отмечалось формирование более контрастных и упорядоченных слоев слизистой оболочки. 4. Сравнительное изучение клинико-функциональных изменений в тканях десны показало, что нет разницы в клиническом эффекте при введении аутофибробластов в участки с разным исходным состоянием тканевого субстрата и с разными временными интервалами между инъекциями.

Полученные результаты клинических, планиметрических и функциональных исследований показали безопасность и эффективность применения аутологичных фибробластов для устранения дефекта мягких тканей после пародонтологических и имплантологических вмешательств.

**КЛЕТОЧНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В ЛЕЧЕНИИ ТРОФИЧЕСКИХ ЯЗВ, ОБУСЛОВЛЕННЫХ ХРОНИЧЕСКОЙ ВЕНОЗНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ.** © А. Ю. Латин, Э. Г. Топузов, М. А. Рубцов, Г. П. Пинаев, М. И. Блинова. Медицинская академия им. И. И. Мечникова и Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, andlap73@yandex.ru.

Трофические язвы (ТЯ) нижних конечностей — проблемное и наиболее часто встречаемое осложнение варикозной болезни (ВБ) и хронической венозной недостаточности (ХВН). Механизм развития ХВН и патогенез об-

разования ТЯ нижних конечностей раскрыты и представлены в многочисленных публикациях. Целью и задачами исследования являлись: определение возможности и целесообразности применения клеточных продуктов в лечении ТЯ нижних конечностей, обусловленных ХВН; разработка методики и техники пересадки клеточных продуктов на язвенный дефект; оценка преимуществ, недостатков и перспектив предлагаемого способа лечения. Представлены результаты по использованию метода заместительной клеточной терапии для лечения ТЯ нижних конечностей, обусловленных хронической венозной недостаточностью. Использовались клеточные продукты — фибробласты и многослойные пласты кератиноцитов (аналоги дермы и эпидермиса кожи), приготовленные на основе культивируемых нормальных фибробластов и кератиноцитов человека, разработанные в Институте цитологии РАН. Срок существования трофических язв у пациентов составлял от 2 до 14 лет, в среднем —  $8.9 \pm 0.6$  года. В контрольные сроки язвы закрылись у 73 пациентов (99.1 %) основной группы и у 20 пациентов (66.7 %) группы сравнения, а средние сроки достижения полной эпителизации ТЯ у основной группы оказались почти вдвое короче ( $16.2 \pm 0.5$  сут), нежели у группы сравнения ( $32.2 \pm 1.1$ ), при  $P < 0.001$ , демонстрируя явное преимущество клеточной терапии в сравнении с традиционными способами лечения. Достичь полного закрытия ТЯ к 90-м сут в основной группе не удалось у 7 пациентов, что составило 8.75 %. Рецидив язвы в указанные сроки наступил только у 1 больного (1.25 %). В группе сравнения к 90-м сут наблюдения достичь полного закрытия ТЯ не удалось у 6 пациентов из 30, что составило 20 % и существенно превышало показатели основной группы ( $P < 0.001$ ). Рецидив язвы в группе сравнения также был более частым явлением и наступил у 4 пациентов (13.3 %). В основной группе и в группе сравнения у лиц, у которых не удалось достичь полного закрытия ТЯ, площадь язвы к 90-м сут наблюдения была достоверно меньше исходной более чем на 50 % ( $P < 0.001$ ). Таким образом, признать безукоризненно идеальными результаты лечения ТЯ с применением клеточных продуктов нельзя, однако сравнительный статистический анализ по основным параметрам (факт закрытия язвы, сроки наступления эпителизации, число рецидивов) демонстрирует существенное преимущество клеточного метода перед традиционной схемой лечения. В настоящее время активно идет работа по использованию комбинированного способа лечения, который включает в себя сочетание пересадки клеточных продуктов и применение эндовидеохирургического способа операции для устранения основной этиологической причины развития ТЯ. Данная методика является передовой и ее первые результаты выглядят весьма оптимистично.

**РЕИНИЦИАЦИЯ МЕЙОЗА IN VITRO В ИЗОЛИРОВАННЫХ И ОКРУЖЕННЫХ КУМУЛУСОМ ООЦИТАХ КОРОВ В ПРИСУТСТВИИ ИНГИБИТОРОВ ФОСФОДИЭСТЕРАЗ И ПРОЛАКТИНА.** © И. Ю. Лебедева,<sup>1,2</sup> Г. Н. Сингина.<sup>2</sup> <sup>1</sup> С.-Петербургский государственный аграрный университет, Санкт-Петербург—Пушкин, и <sup>2</sup> Всероссийский научно-исследовательский институт животноводства РАСХН, Подольск—Дубровицы.

Механизмы поддержания и снятия блокады мейоза в ооцитах млекопитающих до сих пор остаются недоста-



точно исследованными. В регуляции возобновления мейоза участвуют многочисленные сигнальные молекулы, центральную роль среди которых играет цАМФ (Conti et al., 2002). Ранее нами было выявлено взаимодействие сигнальных каскадов, активируемых цАМФ и гипофизарным гормоном пролактином (ПРЛ) в культивируемых ооцит-кумулясных комплексах (ОКК) коров, причем участок сопряжения этих каскадов в ооцитах отличался от такового в клетках кумулюса (Лебедева и др., 2008). Поэтому в представленной работе проведено сравнительное исследование *in vitro* совместного влияния ПРЛ и различных ингибиторов фосфодиэстераз, участвующих в деградации цАМФ, на реинициацию мейоза в изолированных и окруженных кумулюсом ооцитах коров. ОКК выделяли из фолликулов диаметром 2—8 мм. Для получения денудированных ооцитов (ДО) проводили диссоциацию клеток кумулюса путем обработки ОКК коллагеназой II (1 мг/мл) в течение 25 мин при 37 °C. В промытую среду добавляли 0.5 мМ неселективного ингибитора фосфодиэстераз изобутилметилксантина (ИБМК) для торможения преждевременного снижения концентрации цАМФ в клетках. ОКК и ДО культивировали в среде ТС-199, содержащей 10 % фетальной бычьей сыворотки (контроль). В первой серии экспериментов в среду вносили 0.5 мМ ИБМК (Sigma, США) и 20 мкМ активатора аденилатциклазы форсколина (ФК; Biaffin GmbH & Co KG, Германия) и(или) бычий ПРЛ (20 МЕ/мг; Эндокринологический научный центр РАМН, Москва) в концентрации 0, 5, 50 или 500 нг/мл. Во второй серии экспериментов культуральная среда содержала или 20 мкМ циклостамида (ЦМ), ингибитора фосфодиэстеразы 3, или 100 мкМ ролипрама (РП), ингибитора фосфодиэстеразы 4, или 50 нг/мл бычьего ПРЛ, а также ЦМ+ПРЛ или РП+ПРЛ в указанных концентрациях. Морфологически нормальные ОКК и ДО культивировали в течение 6.5 ч при 38.5 °C в атмосфере с 5 % CO<sub>2</sub> и 90%-ной влажностью. Ооциты фиксировали по методу Тарковского и использовали для цитогенетического анализа состояния ядерного материала. Эксперименты по культивированию ооцитов были выполнены в 3—4 независимых повторностях. Достоверность различий между сравниваемыми значениями оценивали с помощью критерия  $\chi^2$ . Было установлено, что ПРЛ во всех использованных концентрациях не влияет на возобновление мейоза в ОКК и ДО, культивируемых в контрольной среде. Внесение ИБМК и ФК в контрольную среду приводило к повышению ( $P < 0.001$ ) доли ооцитов, остающихся на стадии диплотены через 6.5 ч инкубации ДО (с 37.8 до 89.6 %) и ОКК (с 22.2 до 85.7 %). ПРЛ снижал (до 64.4 %,  $P < 0.01$ ) относительное число ДО, не возобновивших мейоз в присутствии ИБМК и ФК, только при концентрации 50 нг/мл. В то же время стимулирующее влияние ПРЛ на реинициацию мейоза в ооцитах, окруженных кумулюсом, было обнаружено в этих условиях уже при 5 нг/мл ( $P < 0.05$ ), хотя максимальный эффект достигался при гормональной концентрации 50 нг/мл (60.5 % ооцитов на стадии диплотены,  $P < 0.01$ ). Не было выявлено тормозящего действия РП, селективного ингибитора фосфодиэстеразы 4, на возобновление мейоза в ДО или ОКК. Среда, содержащая РП+ПРЛ, также не влияла на реинициацию мейоза. Напротив, ЦМ, селективный ингибитор фосфодиэстеразы 3, увеличивал ( $P < 0.001$ ) относительное число ооцитов, находящихся на стадии диплотены, по сравнению с контролем как в случае ДО (с 37.3 до 79.5 %), так и в случае ОКК (с 16.9 до 79.4 %). Внесение ПРЛ в среду, содержащую ЦМ, приводило к уменьшению доли ооцитов,

не возобновивших мейоз, только при культивировании ДО (до 53.8 %,  $P < 0.001$ ). Представленные данные свидетельствуют о том, что стимулирующее влияние ПРЛ на реинициацию мейоза обусловлено, по крайней мере частично, активацией фосфодиэстеразы 3 в ооцитах коров. Кроме того, эти данные показывают, что клетки кумулюса, сопряженные с ооцитами, повышают чувствительность последних к мейозстимулирующему действию ПРЛ.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 07-04-01485).

**ИЗУЧЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ (ЭС) И ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ (иПС, iPS) КЛЕТОК В ЗАМЕСТИТЕЛЬНОЙ ТЕРАПИИ У ЧЕЛОВЕКА.** © М. А. Лисковых,<sup>1</sup> Е. Н. Толкунова,<sup>1</sup> Ю. А. Минина,<sup>2</sup> А. Г. Шилов,<sup>2</sup> Н. С. Петров,<sup>1</sup> Б. В. Попов,<sup>1</sup> Е. В. Чихиржина,<sup>1</sup> Е. И. Костылева,<sup>1</sup> Н. С. Жданова,<sup>2</sup> А. Н. Томилин.<sup>1</sup> <sup>1</sup> Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, antom111@hotmail.com, и <sup>2</sup> Новосибирский государственный университет.

Несмотря на значительный прогресс в области изучения биологии плюрипотентных стволовых клеток, таких как эмбриональные стволовые (ЭС) и недавно открытые индуцированные плюрипотентные стволовые (иПС) клетки, одним из важнейших факторов, стоящих на пути практического применения этих клеток в клинике, является их туморогенность. Известно, что попадание в организм взрослой мыши хотя бы нескольких ЭС-клеток приводит к возникновению тератом. С другой стороны, существующие протоколы направленной дифференцировки ЭС-клеток *in vitro* позволяют получить весьма гетерогенные популяции клеток, в которых практически всегда присутствуют резидуальные недифференцированные клетки, обладающие высоким туморогенным потенциалом. Описанная выше ситуация в полной мере относится и к иПС-клеткам. Таким образом, присутствие даже небольшого количества недифференцированных ЭС/иПС-клеток (и даже одной такой клетки) в трансплантируемом пациенту клеточном материале недопустимо ввиду возможности возникновения тератомы. Соответственно разработка технологий, гарантирующих полное удаление резидуальных ЭС/иПС-клеток из гетерогенных клеточных суспензий или же обеспечивающих получение дифференцированных клеток для тканезаместительной терапии вообще без использования ЭС/иПС-клеток, остается одной из самых актуальных на сегодняшний день задач в области биологии стволовых клеток. Данное исследование направлено на решение этой проблемы, для чего нами намечены и уже частично реализованы 2 подхода. Первым подходом будет являться генетическая сенсibilизация; при этом в ЭС/иПС-клетки вводятся последовательности генетических маркеров-самоубийц, например гена тимидинкиназы (ТК) или рецептора токсина дифтерии (ДТР) под контролем промоторов, поддерживающих экспрессию этих маркеров исключительно в ЭС/иПС-клетках (например, промоторов генов Oct4 или Nanog). Генетически модифицированные ЭС/иПС-клетки затем направляют дифференцировку в желаемое направление, после чего остаточные ЭС/иПС-клетки элиминируются добавлением в среду ганцикловира или токсина дифтерии (ДТ).

После трансплантации введение ганцикловира пациенту может быть продолжено в течение некоторого времени для гарантированного удаления недифференцированных клеток. Следует отметить, что ганцикловир является одобренным FDA (Food and Drug Administration, США) препаратом. Сочетание этих двух маркеров-самоубийц создаст дополнительный уровень безопасности. Так, ТК под промотором Oct4 позволит удалять, как это описано выше, только плюрипотентные, тогда как дополнительно введенный мДТР под транскрипционным контролем повсеместного промотора (EF-1, CMV или др.) позволит элиминировать все трансплантационные клетки. Другим подходом будет являться индуцированная трансдифференцировка. При таком подходе легкодоступные соматические клетки, например фибробласты кожи или клетки крови, будут трансдифференцироваться в клетки наиболее клинически востребованных и малодоступных типов (например, в моторные нейроны или кардиомиоциты) напрямую, т. е. вообще не прибегая к созданию опухолевых ИПС-клеток. Такая трансдифференцировка будет осуществляться через форсированную экспрессию намеченных нами тканеспецифических мастер-регуляторов. Сама по себе возможность получения ИПС-клеток позволяет ожидать, что форсированная трансдифференцировка также достижима. Этот подход, наиболее наукоемкий, помимо его прикладной ценности будет иметь и фундаментальную значимость.

**СТРОМАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ ЖИРОВОЙ ТКАНИ СПОСОБНЫ СТИМУЛИРОВАТЬ РОСТ НЕРВНЫХ ВОЛОКОН IN VITRO И ДИФФЕРЕНЦИРОВАТЬСЯ В НЕЙРАЛЬНОМ НАПРАВЛЕНИИ.** © Т. В. Лопатина, И. А. Спирина, Н. И. Калинина, Е. В. Парфенова, В. А. Ткачук. Факультет фундаментальной медицины Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова.

В последнее время жировая ткань исследуется как потенциальный источник аутологичных стволовых клеток. Стромальные клетки жировой ткани (СКЖТ) обладают такими же свойствами мезенхимных стволовых клеток, как и клетки костного мозга, но их значительно легче получить в достаточном количестве для любого пациента. СКЖТ способны дифференцироваться во многие типы клеток и секретировать факторы роста (Traktuev et al., 2006), стимулирующие восстановление тканей, включая заживление ран (Ebrahimian et al., 2009) и активацию роста кровеносных сосудов (Rubina et al., 2009). В то же время известно, что ангиогенез сопряжен с ростом нервов: у этих процессов общий механизм регуляции и контролируемые их сигнальные молекулы (Carmeliet, 2003). Поэтому мы предположили, что СКЖТ способны стимулировать рост нервных волокон. Для проверки этой гипотезы мы использовали модель роста кровеносных сосудов в подкожном имплантате Матригеля. Оказалось, что СКЖТ стимулирует рост нервных волокон *de novo*, причем культивирование СКЖТ при пониженном содержании кислорода (1 % O<sub>2</sub>) усиливает этот стимулирующий эффект. Чтобы изучить влияние СКЖТ на растущие нервные окончания, мы проанализировали экспрессию нейротрофических факторов в СКЖТ и их способность к нейральной дифференцировке. Мы показали, что СКЖТ секретируют нейротрофические факторы BDNF (brain derived neurotrophic factor), NGF (nerve growth factor) и GDNF (glial cell derived neurotrophic factor). Известно, что эти ней-

ротрофические факторы секретируются в тканях, нуждающихся в иннервации, и привлекают растущие нервные окончания. Культивирование СКЖТ в условиях пониженного содержания кислорода (1 %) повышает уровень экспрессии этих факторов. Это дает возможность предположить, что при трансплантации СКЖТ в ишемизированную ткань эти клетки также будут усиленно секретировать факторы роста. Таким образом, мы показали, что секреторная активность СКЖТ стимулирует рост нервов. В то же время есть данные по нейральной дифференцировке СКЖТ, поэтому мы решили проверить их способность дифференцироваться и встраиваться в растущие нервные волокна. Ранее нами было показано, что добавление в среду культивирования нейротрофического фактора BDNF или ретиноевой кислоты в сочетании с деметилирующим агентом 5-азациитидом индуцирует нейральную дифференцировку СКЖТ (Лопатина и др., 2009). Поэтому мы в этих условиях получили дифференцированные СКЖТ мыши, экспрессирующие маркерный белок GFP, и обнаружили, что такие клетки повышают уровень экспрессии нейротрофических факторов и сильнее стимулируют рост нервных волокон в Матригель. Нервы в имплантате мы детектировали антителами против белка растущих нервных окончаний и предшественников шванновских клеток GAP43. При анализе срезов Матригеля мы обнаружили клетки, позитивные по белкам GFP и GAP43. Это означает, что трансплантированные СКЖТ, экспрессирующие GFP, при введении в составе Матригеля под кожу мышам начинают экспрессировать GFP43. Вероятно, в популяции СКЖТ есть предшественники шванновских клеток. Чтобы изучить популяцию СКЖТ на предмет содержания нейральных предшественников, мы попытались выделить популяцию клеток, экспрессирующих рецепторы нейротрофических факторов. Для этого СКЖТ были прижизненно окрашены антителами против рецептора BDNF белка TrkB и методом проточного сортирования TrkB-позитивные клетки были отделены от остальных. При изучении дифференциальной экспрессии генов в TrkB<sup>+</sup>- и TrkB<sup>-</sup> популяциях мы обнаружили, что TrkB<sup>+</sup>-клетки имеют повышенный уровень экспрессии нейральных маркеров. Также эти клетки экспрессируют другие рецепторы нейротрофических факторов — белки p75, TrkA, TrkC и рецептор neuregulin1, присутствующий на поверхности нейральных клеток. Содержание TrkB<sup>+</sup>-клеток в популяции СКЖТ было около 10 ± 5 %. На основе полученных данных можно сделать вывод о том, что СКЖТ содержат субпопуляцию клеток, которые способны дифференцироваться в нейральном направлении, стимулировать рост нервных волокон и непосредственно участвовать в их формировании.

**АНТИГЕННАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НЕЙРАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ИЗ ОЛЬФАКТОРНОЙ ЛУКОВИЦЫ ЧЕЛОВЕКА В УСЛОВИЯХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ.** © Л. Д. Любич, Н. И. Лисяный, В. М. Семенова, Л. П. Стайно. ГУ «Институт нейрохирургии им. акад. А. П. Ромоданова АМН Украины», Киев.

Использование нейральных стволовых клеток (НСК) открывает новые возможности в лечении и поддерживающей терапии таких нейродегенеративных заболеваний нервной системы, как болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера, рассеянный склероз, постинсультные и посттравматические состояния. Это подтверждается поло-



жительным лечебным эффектом применения НСК в эксперименте на ряде моделей, воспроизводящих церебральную и спинальную патологию. Настоящая работа является продолжением исследования биологии регионарных стволовых клеток (СК), полученных во время операции из ольфакторной луковицы (ОЛ) от взрослых пациентов. ОЛ как динамическая макросистема с нейрогенераторными свойствами содержит НСК, мигрирующие в нее из субвентрикулярной зоны с последующей дифференциацией в зрелые нейроны и глиоциты. При культивировании в среде с митогенами НСК из ОЛ способны к самовоспроизведению с формированием нейросфер, а в присутствии ретиноевой кислоты дифференцируются в мультиполярные нейроны. В работе сообщаются результаты определения антигенного фенотипа культивированных нейроклеток из ОЛ, поскольку остаются неясными механизмы выживания и отторжения клеточных имплантатов, а также влияние микроокружения на процессы их интеграции и дифференцировки в нервной ткани реципиента. Данные литературы по этому вопросу немногочисленны и неоднозначны, что обосновывает актуальность исследований по этой проблеме.

**Материал и методика.** Клеточную суспензию, полученную из ткани ОЛ ( $n = 6$ ) диссоциированием в коллагеназе, культивировали в питательной среде стандартного состава (DMEM, эмбриональная телячья сыворотка (40 %), глюкоза (800 мг %), инсулин (0.2 ед./мл)) с наличием факторов роста. На 0, 10 и 20-е сут культивирования на поверхности нейроклеток исследована экспрессия антигенов CD34 (маркер ранних гемопоэтических СК), CD38 (маркер поздних гемопоэтических СК), CD56 (молекула нейрональной адгезии), HLA-A, B, C (антигены гистосовместимости I класса) и HLA-DR (антигены гистосовместимости II класса) с помощью иммунофенотипирования непрямым иммунофлуоресцентным методом.

**Результаты.** Установлено, что первоначальный клеточный состав нейроклеток, полученных из ОЛ взрослых пациентов, по антигенному профилю является гетерогенным и меняется в ходе дальнейшего культивирования. При сравнительном анализе в динамике наблюдения количество нейроклеток, экспрессирующих маркер поздних гемопоэтических СК (CD38), несколько снижалось, тогда как доля клеток, экспрессирующих маркер ранних гемопоэтических СК (CD34) и молекулу нейрональной адгезии (CD56), изменялась незначительно. В то же время количество клеток, экспрессирующих антигены гистосовместимости I и II классов, снижалось более значительно — в 2—5 раз. Обнаруженная динамика антигенного профиля в культивируемых клетках ОЛ несколько отличается от таковой в культурах фетального и эмбрионального мозга, исследованных нами ранее. Так, доля HLA-A, B, C- и HLA-DR-экспрессирующих клеток была наименьшей среди нейроклеток человека 5 нед гестации, постепенно увеличиваясь до 8—9 нед гестации. Культивирование нейроклеток человека 5—9 нед гестации в среде с добавлением ретинола ацетата способствовало снижению в 2—5 раз количества клеток, экспрессирующих антигены гистосовместимости I и II классов, тогда как добавление в среду факторов роста сохраняло количество этих клеток (FGF) в течение культивирования или увеличивало их количество (EGF) до 14-х сут культивирования. Из полученных результатов следует предварительный вывод о том, что в указанных условиях культивирования антигены гистосовместимости подвергаются модуляции,

тогда как изученные дифференцировочные антигены (CD34, -38, -56) подвержены модуляции в меньшей степени.

Таким образом, особенности экспрессии антигенов МНС на поверхности НСК эмбрионального и зрелого мозга обнаруживают определенные различия, что необходимо учитывать при их практическом применении.

**ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ 5'-НУКЛЕОТИДАЗЫ ЭНДОТЕЛИЯ ПОД ДЕЙСТВИЕМ НЕЙРОНАЛЬНЫХ И АНГИОГЕННЫХ ФАКТОРОВ.** © И. В. Лямина, Е. П. Киселева. НИИ экспериментальной медицины СЗО РАМН, Санкт-Петербург.

5'-нуклеотидаза — фермент пуринового обмена, играющий важную роль в регуляции сосудистой проницаемости. Он располагается на мембране эндотелиальных клеток и дефосфорилирует АМФ с образованием свободного аденозина, который, как считают некоторые авторы, способен подавлять трансэндотелиальную миграцию лейкоцитов и их выход в очаг воспаления (Jalkanen, Salmi, 2007). В условиях повреждения ткани и последующей регенерации в организме повышается концентрация нейрональных и ангиогенных факторов, которые могут вносить существенный вклад в регуляцию сосудистой проницаемости. В частности, известно, что нейрональный фактор семафорин 3А и фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) оба усиливают проницаемость эндотелия, причем их эффекты суммируются (Acevedo et al., 2008). Их влияние на активность 5'-нуклеотидазы не изучено. Целью настоящей работы послужило изучение влияния VEGF и семафорина 3А на 5'-нуклеотидазу эндотелиальных клеток *in vitro*.

Для определения активности 5'-нуклеотидазы клетки эндотелия человека линии EA.hy926 вносили в 96-луночный планшет по  $4 \cdot 10^5$  на лунку в среде DMEM с 10 % FCS и преинкубировали в течение 24 ч в  $\text{CO}_2$ -инкубаторе при 37 °C до получения конфлюэнтного монослоя. Затем к клеткам добавляли исследуемые факторы в различных концентрациях и инкубировали еще 24 ч, после чего монослой отмывали 3 раза бесфосфатным физиологическим раствором. Затем в каждую лунку добавляли субстрат 2.2 мМ 5'-АМФ и инкубировали 1 ч при 37 °C. Растворимый неорганический фосфат определяли спектрофотометрически при длине волны 750 нм. Для определения специфической активности 5'-нуклеотидазы из показателя общей фосфатной активности, описанного выше, вычитали неспецифическую фосфатазную активность, для получения которой в качестве субстрата вместо АМФ использовали  $\beta$ -глицерофосфат в той же молярности. Фосфатазную активность выражали в виде мкМ неорганического Р, продуцированного 1 млн клеток за 1 ч. Количество клеток после внесения в лунки в течение суток не изменялось, что было установлено при инкубации клеток в отдельном планшете. Клетки эндотелия снимали со дна лунок раствором Версена и подсчитывали в камере Горяева.

Были получены следующие результаты. Активность 5'-нуклеотидазы в отсутствие факторов составила  $18.35 \pm 0.18$  мкМ/ч на  $10^6$  клеток. В качестве препарата сравнения использовали TNF- $\alpha$  (50 ед./мл) как известный стимулятор клеток эндотелия и фактор, усиливающий трансэндотелиальную миграцию лейкоцитов. TNF- $\alpha$  достоверно снижал активность фермента  $15.45 \pm 0.26$

( $P < 0.001$ ,  $n = 14$ ), что согласуется с данными литературы (Kalsi et al., 2002). VEGF в концентрации 1—100 нг/мл оказывал дозозависимое подавление активности 5'-нуклеотидазы с максимальным эффектом в дозе 10 нг/мл  $17.25 \pm 0.32$  ( $P < 0.001$ ,  $n = 15$ ). Семафорин 3А, наоборот, в концентрации 1—500 нг/мл дозозависимо усиливал активность эктофермента с максимальным эффектом в дозе 100 нг/мл  $20.05 \pm 0.37$  ( $P < 0.05$ ,  $n = 15$ ). Культивирование клеток эндотелия с двумя факторами одновременно в эквивалентных концентрациях приводило к повышению активности 5'-нуклеотидазы  $20.05 \pm 0.37$  ( $P < 0.001$ ,  $n = 9$ ).

Таким образом, VEGF и семафорин 3А оказывают разнонаправленное действие в отношении фермента 5'-нуклеотидазы на поверхности клеток эндотелия человека, что может иметь существенное значение для регуляции сосудистой проницаемости в условиях тканевого повреждения.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 09-04-00429).

**ШАПЕРОНЫ КАК «ИДЕАЛЬНЫЕ» ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ СРЕДСТВА.** © Б. А. Маргулис. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Причина многих заболеваний, в том числе нейродегенеративных, мышечных, метаболических и иных патологий, заключается в появлении внутри или вне клетки белков с неправильной конформацией, которые или сами, или их агрегаты являются цитотоксическими. Классическими примерами подобных патологий являются болезни Альцгеймера, Гентингтона, прионная болезнь и многие другие, практически все из которых основаны на различных (и специфических) патогенных белках. В клетках организма существует большое число систем, призванных бороться с агрегацией патогенных белков и основанных на шаперонах. Шапероны, в частности Hsp70 и Hdj1/Hsp40, способны узнавать гидрофобные ферменты поврежденных или мутантных полипептидов и выправлять их структуру в АТФ-зависимом цикле связывания—высвобождения. «Неисправимые» белки также при содействии Hsp70 подвергаются протеолизу в протеасомах и лизосомах. С шаперонной активностью связывают защитные эффекты, которые демонстрируют белки Hsp70 и Hdj1 в различных стимуляциях упомянутых выше патологий *in vitro* и *in vivo*. Безусловно важным является то, что шаперон Hsp70 проявляет протекторную активность по обе стороны клеточной мембраны: находясь внутри клетки, он защищает ее, а выходя во внеклеточное пространство, кровоток, шаперон защищает уже весь организм. Собранные к настоящему времени данные позволяют утверждать, что принцип действия многих известных лекарств или средств народной медицины заключается в том, что они активируют синтез шаперонов и их экспорт клетками. Таким образом, можно сделать вывод о необходимости разработки шаперонных препаратов на основе самих белков или низкомолекулярных соединений, эффективно повышающих экспрессию шаперонов. В этой работе следует использовать различные клеточные модели заболеваний, социально значимых и с установленными механизмами. Многие из таких моделей уже разработаны, и опыт показывает, что они действительно удобны для высокопроизводительного скрининга различных шаперонных препаратов.

В подобных исследованиях используют 96-луночные платы с клетками, моделирующими какую-либо патологию и которые обрабатывают определенными факторами. В качестве примера действия этой технологии в докладе будут представлены данные о поиске факторов, снижающих уровень агрегации продукта мутантного гена хантингтина в модели соответствующей патологии.

**БИОДЕГРАДИРУЕМЫЕ МИКРОНОСИТЕЛИ С ВКЛЮЧЕННЫМИ В НИХ БИОАКТИВНЫМИ ПЕПТИДАМИ ДЛЯ ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ.** © Е. А. Марквичева,<sup>1</sup> А. М. Цой,<sup>1</sup> И. А. Прудченко,<sup>1</sup> К. Грандфис.<sup>2</sup> <sup>1</sup> Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова, Москва, lemark@mx.ibch.ru, и <sup>2</sup> Межфакультетский центр биоматериалов, Университет г. Льеж, Бельгия.

Биодеградируемые микроносители являются перспективными материалами для тканевой инженерии. Микроносители имеют ряд преимуществ по сравнению с другими имплантируемыми полимерными матрицами (scaffolds), в частности их можно легко вводить в организм в виде суспензии в водных растворах через иглу, они имеют значительную поверхность, которую можно предварительно модифицировать и функционализировать для обеспечения наилучшей адгезии клеток.

Целью данной работы является создание новых биодеградируемых микроносителей на основе сополимера молочной и гликолевой кислот (PLGA), в которые инкапсулированы биоактивные пептиды, ускоряющие процесс репарации тканей. Таким образом, микроносители должны выполнять 2 функции: служить матриксом для прикрепления и пролиферации клеток и обеспечивать контролируемое высвобождение биоактивных пептидов, ускоряющих рост и пролиферацию клеток. Для модификации поверхности микроносителей были использованы различные природные и синтетические биосовместимые полимеры. Среди прочих биологически активных веществ, способных ускорять процесс репарации тканей, в последнее время повышенное внимание уделяется белкам и пептидам (гормонам, различным факторам роста др.). Особое место среди них занимает тромбин (сериновый протеаза семейства трипсина), который не только регулирует свертывающие и противосвертывающие механизмы и ангиогенез, является фактором роста, но также включается в воспалительную и пролиферативную фазы ранозаживления, при этом стимулируя пролиферацию клеток эндотелия, фибробластов и продукцию последними коллагена. Однако применение тромбина ограничено его высокой лабильностью и высокой стоимостью. Некоторые синтетические пептиды могут имитировать действие тромбина в процессе регенерации ткани. Являясь более дешевыми по сравнению с тромбином, пептиды, однако, очень быстро расщепляются пептидазами в организме. Инкапсулирование пептидов в биосовместимые полимерные матрицы (микроносители) позволяет как защитить пептиды от разрушения, так и направленно регулировать их высвобождение *in vivo*. В данной работе в качестве биоактивных пептидов использовали пептид-агонист тромбинового рецептора TRAP-6 (thrombin receptor agonist peptide) и его аналог TRAP-6(M), отличающийся от TRAP-6 одной аминокислотой. Оба пептида были синтезированы в ИБХ РАН. TRAP-6 является низкомолекулярным гексапепти-



дом с аминокислотной последовательностью Ser-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn (SFLLRN). Ранее эти пептиды были нами успешно использованы для ускорения заживления кожных ран (в моделях на мышах и крысах) и лечения язвы желудка в модели на крысах. В работе была синтезирована серия микроносителей с включенными в них пептидами, исследованы некоторые физико-химические свойства (распределение по размерам, рельеф поверхности, Z-потенциал поверхности и др.), исследована кинетика высвобождения пептидов в модели *in vitro*, а также продемонстрирована эффективность использования полученных микроносителей для роста клеток. В качестве модельных клеток были, в частности, использованы линия фибробластов мыши L-929 и некоторые другие клеточные культуры.

Таким образом, разработанные биodeградируемые микроносители могут быть предложены в качестве перспективных материалов для клеточной и тканевой инженерии.

**РОЛЬ ЯДРА И ЦИТОПЛАЗМЫ В ИЗМЕНЕНИИ ДОМИНИРОВАНИЯ ГЕНОМОВ В ГИБРИДНЫХ КЛЕТКАХ ОТ СЛИЯНИЯ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК И ТЕТРАПЛОИДНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ МЫШИ.**  
© Н. М. Матвеева, А. А. Круглова, О. Л. Серов. Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, matveeva@ngs.ru.

Представления об обратимости дифференцировки — одного из фундаментальных вопросов биологии развития — значительно расширились в последнее время благодаря развитию современных экспериментальных технологий. Успешные эксперименты по получению клонированных животных разных видов показали, что цитоплазма энуклеированного ооцита способна репрограммировать внесенное ядро дифференцированной клетки до тотипотентного состояния. Другой экспериментальный подход к исследованию репрограммирования генома основан на гибридизации плюрипотентных эмбриональных стволовых и соматических клеток. К настоящему времени хорошо известно, что такие гибридные клетки доминантно проявляют плюрипотентные свойства эмбриональных стволовых клеток (ЭСК), а геном соматической клетки в них подвергается репрограммированию. Однако однозначного ответа на вопрос о том, может ли цитоплазма ЭСК подобно цитоплазме ооцитов репрограммировать ядро соматической клетки или необходимо взаимодействие двух геномов в гибридной клетке, в этих исследованиях не было получено. Доминирование генома ЭСК в гибридных клетках не зависит от типа участвующих в слиянии соматических клеток и не связано с потерей хромосом соматического партнера, как показано в работах нашей группы и в других исследованиях. При этом следует отметить, что все исследования такого рода были проведены только на диплоидных клетках обоих партнеров по слиянию.

Противоположные результаты мы получили при использовании в гибридизации с ЭСК тетраплоидных фибробластов: все клоны гибридных клеток имели фенотип и свойства фибробластов, в них происходила экспрессия коллагена 1-го типа и фибронектина и отсутствовали маркеры плюрипотентных клеток (Oct-4 и Nanog). Причем участвующие в двух независимых гибридизациях фибробласты были получены в результате спонтанной тет-

раплоидизации в культурах клеток мышей двух разных линий — DD/c и C57Bl/6-I(I)1RK. Таким образом, в гибридных клетках типа ЭСК-тетраплоидный фибробласт доминировал геном фибробластов в отличие от гибридных клеток типа ЭСК-диплоидный фибробласт при практически полном сохранении хромосом обоих родительских клеток в обоих случаях.

Чтобы ответить на вопрос о том, способна ли цитоплазма тетраплоидных клеток влиять на изменение доминирования геномов в гибридной клетке, мы провели серию слияний ЭСК как с цитопластами (безъядерными фрагментами), так и с кариопластами, выделенными из тетраплоидных фибробластов. Для получения цитопластов и кариопластов был применен метод высокоскоростного центрифугирования в градиенте фиколла. Фибробласты предварительно инкубировали с микрофлуоросферами, светящимися в синем спектре, вследствие фагоцитоза они проникали в цитоплазму и служили ее маркерами. В результате слияния ЭСК, экспрессирующих зеленый флуоресцентный белок, с цитопластами тетраплоидных фибробластов, маркированными флуоросферами, мы могли идентифицировать гибридные клетки с момента их образования. Все гибридные клетки (гибриды) имели фенотип ЭСК и экспрессировали Oct-4 и Nanog. Напротив, при слиянии ЭСК и тетраплоидных кариопластов колонии гибридных клеток имели фенотип и свойства фибробластов. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что ядро, но не цитоплазма тетраплоидного фибробласта определяет доминирование генома фибробласта в гибридных клетках типа ЭСК-тетраплоидный фибробласт. Вероятно, это событие обусловлено дозой генов соматического партнера.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 07-04-00528).

**ВЛИЯНИЕ АУТОЛОГИЧНЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА НА РЕГЕНЕРАЦИЮ ИШЕМИЗИРОВАННЫХ ТКАНЕЙ У ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ.**  
© А. А. Матюков,<sup>1</sup> Н. В. Цупкина,<sup>2</sup> В. В. Давыденко,<sup>1</sup> В. В. Гриценко,<sup>1</sup> Г. П. Пинаев.<sup>2</sup> <sup>1</sup> С.-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова и <sup>2</sup> Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Несмотря на значительные успехи современной медицины, сердечно-сосудистые заболевания по-прежнему остаются главной причиной смертности среди населения. Используемые в настоящее время консервативные и оперативные методы лечения сердечно-сосудистых заболеваний не всегда эффективны или не могут быть применены по ряду причин. В связи с этим разрабатываются новые способы регенерации поврежденных тканей на основе современных достижений молекулярной и клеточной биологии. Так, в последние 5—7 лет успешно реализуется идея клеточной трансплантации для лечения ишемической болезни сердца и облитерирующих заболеваний артерий.

Экспериментальные исследования в этой области нашими коллективами были начаты более 5 лет назад. Цель исследования состояла в сравнении влияния мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (ММСК) и нефракционированных ядросодержащих клеток (ЯСК)

костного мозга на регенерацию ишемизированных тканей кролика. Эксперименты проведены на кроликах-самцах линии Шиншилла, которым были смоделированы инфаркт миокарда посредством лигирования нисходящей ветви левой коронарной артерии и ишемия задней конечности путем перевязки бедренной артерии. В работе использовали культуры ММСК и ЯСК, полученные из аспириата костного мозга. Характеристику клеточных культур проводили путем окрашивания стандартной смесью реактивов BCIP-NBT (Sigma, США) на щелочную фосфатазу для идентификации клеток остеогенной дифференцировки и суданом-III (BDH Chemicals Ltd., Англия) для идентификации клеток адипоцитарной дифференцировки. Эффективность трансплантации клеток оценивали с помощью электрокардиографии, эхокардиографии, однофотонной эмиссионной компьютерной томографии, ультразвуковой доплерографии, иммуногистохимических и морфологических методов.

Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что клетки аутологичного костного мозга положительно влияют на репаративные процессы в ишемизированных тканях. Можно предположить, что трансплантированные ММСК главным образом влияют на репаративные процессы за счет стимуляции неоангиогенеза путем их дифференцировки в сосудистые структуры и выработки ангиогенных факторов, а ЯСК — за счет секреции ростовых факторов. Однако механизм влияния аутологичных клеток костного мозга до конца не изучен, что требует проведения дальнейших исследований.

**ВЛИЯНИЕ ФАКТОРОВ РОСТА НА МЕЗЕНХИМНЫЕ СТРОМАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ НЕАДГЕЗИВНЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ ИЗ КОСТНОГО МОЗГА КРЫСЫ.** © Е. А. Молчанова, Э. И. Буеверова. Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН, Москва, molchanova\_jane@mail.ru.

Мезенхимные стромальные клетки (МСК) обладают высокой чувствительностью к действию различных ростовых факторов, в частности к основному фактору роста фибробластов (bFGF), эпидермальному фактору роста (EGF) и фактору роста тромбоцитов (PDGF). В настоящей работе изучали влияние факторов роста на эффективность клонирования и потенции к остеогенной и адипогенной дифференцировке МСК неадгезивных субпопуляций из костного мозга крысы. МСК, обладающие высокой клоногенной способностью, идентифицировали как колониеобразующие единицы фибробластов (КОЕ-Ф) из суспензии клеток, не прикрепившихся к поверхности пластика в первичной культуре спустя 7 сут *in vitro*. При более длительных сроках культивирования эта неадгезивная популяция при еженедельном пересеве становится источником последующих неадгезивных субпопуляций. Подсчет числа КОЕ-Ф показал, что эффективность клонирования МСК неадгезивных субпопуляций возрастает под действием факторов EGF и PDGF в концентрации 10 нг/мл, а фактор роста bFGF (5 нг/мл) подавляет колониеобразование. EGF и PDGF не меняют количество колоний МСК неадгезивных субпопуляций, окрашивающихся на щелочную фосфатазу, являющуюся маркером ранних предшественников остеогенных клеток, в то время как PDGF в индукционной среде вызывает увеличение количества и размеров очагов скопления полигональных остеогенных клеток с отложениями минерализованного

внеклеточного матрикса (костных узелков). Фактор bFGF вызывает значительные изменения остеогенных потенций МСК неадгезивных субпопуляций — увеличение числа колоний, содержащих клетки, экспрессирующие щелочную фосфатазу, многократное увеличение количества формируемых в культуре костных узелков и их размеры, а также ускорение самого процесса остеогенной дифференцировки. Влияние bFGF на остеогенные потенции МСК неадгезивных субпопуляций усиливается при изменении его концентрации с 5 до 20 нг/мл. Показано также стимулирующее влияние bFGF на адипогенную дифференцировку при культивировании МСК неадгезивных субпопуляций в стандартной индукционной среде. Количество скоплений адипоцитов разной степени зрелости, а также интенсивность их формирования находятся в прямой зависимости от концентрации bFGF (5—20 нг/мл). Таким образом, МСК неадгезивных субпопуляций проявляют высокую чувствительность к действию факторов роста в культуральной среде. Анализ идентичности пролиферативного и дифференцировочного потенциалов МСК неадгезивных субпопуляций и первичной адгезивной популяции является предметом наших дальнейших исследований.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 09-04-00002) и гранта президента РФ «Ведущие научные школы» (НШ-1134.2008.4).

**ОБОСНОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МАКРОФАГОВ ДЛЯ РЕГЕНЕРАЦИИ/РЕПАРАЦИИ НЕРВНОЙ ТКАНИ.** © А. А. Останин, Е. Я. Шевела, Л. В. Сахно, Е. Р. Черных. НИИ клинической иммунологии СО РАМН, Новосибирск ct\_lab@mail.ru.

Среди различных клеток макрофаги играют исключительно важную роль в процессах тканевой репарации. Однако при повреждениях нервной ткани процессы репарации происходят менее эффективно, что отчасти может быть обусловлено иммунологической привилегированностью центральной нервной системы (ЦНС). Введение макрофагов в модели травмы спинного мозга у экспериментальных животных существенно улучшает восстановление неврологического статуса [Franzen, 1998; Rapolino, 1998; Schwartz, 1999]. Более того, первая фаза клинических испытаний макрофагов в лечении больных спинальной травмой (стадия А по шкале ASIA) показала безопасность и клиническую эффективность их использования при введении в область повреждения (Schwartz, 2004).

Механизмы позитивного эффекта макрофагов остаются во многом неисследованными. Известно, что травматическое повреждение ЦНС приводит к разрыву аксонов, индуцирует функциональную энергию нервных клеток, гибель клеток макро- и микроглии. Учитывая, что макрофаги способны продуцировать нейротрофические факторы, а также цитокины, участвующие в регуляции процессов апоптоза, воспаления и организации внеклеточного матрикса, можно предполагать их выраженное влияние и на процессы репарации нервной ткани. Были использованы два протокола генерации макрофагов из прилипающей фракции мононуклеарных клеток ( $5 \cdot 10^6$ /мл, 18 ч) периферической крови здоровых доноров. В первом протоколе популяция макрофагов (МФ<sub>1</sub>) получали в 6-луночных планшетах в среде RPMI-1640,



дополненной 5 % аутоплазмы и 2 % FCS (Биолот, Санкт-Петербург), 2-меркаптоэтанолом ( $5 \cdot 10^{-5}$  М), пируватом Na ( $2 \cdot 10^{-3}$  М), 1%-ным раствором незаменимых аминокислот, L-глутамином (0.3 мг/мл) в присутствии GM-CSF (50 нг/мл), в течение 6 сут. Во втором протоколе популяцию макрофагов (МФ<sub>2</sub>) получали в культуральных флаконах (Nunc, 75 см<sup>2</sup>) в среде RPMI-1640, дополненной 2 % аутоплазмы, 2-меркаптоэтанолом, пируватом Na, 1%-ным раствором незаменимых аминокислот, L-глутамином в присутствии GM-CSF (50 нг/мл), в течение 7—8 сут.

Исследование фенотипа и функциональной активности МФ<sub>1</sub> и МФ<sub>2</sub> показало, что среди них содержатся 81—82 % CD14-макрофагов. Однако в популяции МФ<sub>2</sub> количество клеток, экспрессирующих антигены HLA-DR и костимуляторные молекулы CD86, было достоверно ниже, чем среди МФ<sub>1</sub> (Median 81 против 93 % и 16 против 37 % соответственно). Кроме того, популяция МФ<sub>2</sub> характеризовалась более низкой аллостимуляторной активностью в СКЛ (индекс влияния 2.7 против 18.4 расч. ед.,  $P < 0.01$ ). Оценка содержания 23 цитокинов в супернатантах культивированных клеток показала, что по сравнению с МФ<sub>1</sub> популяция МФ<sub>2</sub> клеток характеризовалась более низким уровнем продукции Th1/провоспалительных цитокинов (IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-1b, TNF- $\alpha$  и IL-18), хемокинов (IL-8 и MCP-1) и IL-4. В то же время МФ<sub>2</sub> достоверно выше секретируют инсулиноподобный ростовой фактор-1 (IGF-1; 8310 против 322 пг/мл), фактор роста эндотелия сосудов (VEGF; 1100 против 97 пг/мл), эритропоэтин (4.3 против 2.4 мIU/мл) и IL-6 (15 730 против 4530 пг/мл). Уровень продукции других ростовых факторов — эпидермального ростового фактора (EGF), основного фактора роста фибробластов (FGF-basic), G-CSF, GM-CSF — и цитокинов (IL-5, IL-10, IL-13, IL-12, IL-17, IL-7 и MIP1-b) был сопоставим в культурах МФ<sub>1</sub> и МФ<sub>2</sub>.

В целом оценка цитокин-секреторной активности генерированных *in vitro* макрофагов показала, что МФ<sub>2</sub> умеренно продуцируют TNF- $\alpha$  и IL-1b, которые в физиологических концентрациях, как известно, стимулируют процесс миелинизации поврежденных аксонов, а также G-CSF и GM-CSF, которые могут активировать клетки микроглии в очаге повреждения. В то же время МФ<sub>2</sub> активно секретируют нейротрофические факторы (IL-6 и IGF-1) и ряд других ростовых факторов (VEGF, эритропоэтин, EGF и FGF-basic), которые могут повышать выживаемость, усиливать пролиферацию, дифференцировку/деление астроцитов, олигодендроцитов, нейронов и эндотелиальных клеток, а также стимулировать эндогенные, в том числе и нейральные прогениторные, клетки (Lotan, 1994; Simard, 2006). Таким образом, по своей функциональной активности популяция МФ<sub>2</sub> обладает потенциалом, необходимым для стимуляции регенерации/репарации нервной ткани в очаге повреждения, в сочетании с минимальным риском развития выраженных местных воспалительных реакций (физиологический уровень продукции Th1/провоспалительных цитокинов и хемокинов, сниженная экспрессия HLA-DR и CD86, низкая аллостимуляторная активность).

**СОЗДАНИЕ НОВЫХ РАССАСЫВАЮЩИХСЯ МАТЕРИАЛОВ НА ОСНОВЕ ПРИРОДНЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК КОЖИ ЧЕЛОВЕКА, ПРЕДНАЗНАЧЕННЫХ ДЛЯ ЗАМЕСТИ-**

**ТЕЛЬНОЙ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ. © Е. Ф. Панарин,<sup>1</sup> Л. А. Нудьга,<sup>1</sup> В. А. Петрова,<sup>1</sup> А. М. Бочек,<sup>1</sup> М. И. Блинова,<sup>2</sup> Н. М. Юдинцева,<sup>2</sup> Л. В. Кухарева,<sup>2</sup> Г. П. Пинаев.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Институт высокомолекулярных соединений РАН и <sup>2</sup> Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Интенсивное развитие клеточных технологий, применяемых в новой области медицины — регенеративной медицине, требует разработки новых материалов, которые могут служить субстратами для культивируемых клеток. Обязательным условием для таких материалов является их резорбция при имплантации в организм соответствующих клеточных продуктов. В течение ряда лет ИВС РАН и ИЦ РАН проводили совместную работу по созданию биodeградируемых матриц на основе полисахаридов — хитина и хитозана и их композиций с синтетическими полимерами и с коллагеном. Цель данной работы — создание и всесторонняя характеристика пористых пленочных и губчатых композиционных матричных материалов, изучение влияния структурной организации полимеров, состава матриц и их морфологии на возможность формирования на поверхности многослойных пластов кератиноцитов и фибробластов, а также изучение резорбции полученных матриц в процессе заживления ран в результате их трансплантации в модельную рану лабораторных животных. В процессе работы были созданы и исследованы пленочные матрицы на основе частично дезацелированного хитина, хитозана и композиций хитозана с коллагеном, а также трехмерные губчатые матрицы на основе хитозана и композиций хитозана с коллагеном.

Исследования были продолжены в направлении создания композиционных пленок на основе хитина и хитозана с улучшенными физико-механическими свойствами при сохранении характеристик, необходимых для адгезии и пролиферации фибробластов и кератиноцитов. Добавки небольших количеств полимера—модификатора существенно изменяют деформационно-прочностные свойства волокон и пленок. В качестве модифицирующих полимеров были использованы нетоксичные полимеры, широко используемые в медицине: поливиниловый спирт (ПВС), целлюлоза и специально подготовленный коллаген. Пленки из композиций на основе хитина формовали сухо-мокрым способом, отмывали от хлорида лития и хранили в 50%-ном водном растворе этанола. Пленки на основе хитозана формовали сухим способом и прогревали при 120 °С, хранили в сухом состоянии на воздухе. Композиционные пленочные материалы формовали сухим способом из водных растворов хитозана и коллагена в разбавленных уксусной и глутаминовой кислотах. Губчатые материалы получали путем лиофильной сушки растворов смесей полимеров. Полученные материалы прогревали при 50 °С.

При культивировании фибробластов на композиционных пленках установлено, что введение в хитин ПВС и целлюлозы приводит к существенному ухудшению условий роста клеток на композиционных пленках — наблюдались лишь частичная адгезия фибробластов и отсутствие образования монослоя. Введение коллагена в хитозан, напротив, приводит к улучшению адгезии и пролиферации клеток. При посеве нормальных дермальных фибробластов кожи человека на образцы композиционных пленок хитозана с коллагеном (5 и 10 %) через 1 сут наблюдались адгезия клеток на поверхности пленок и нормальная морфология клеток, сопоставимая с контролем. Через 6 сут клетки сформировали монослой.

Была изучена резорбция полученных пленочных и губчатых матричных материалов в процессе заживления ран в результате трансплантации в модельную рану лабораторных животных фибробластов кожи человека, культивируемых на указанных матрицах. О состоянии матричных материалов, на которых культивировались клетки заживления, судили по гистологическому анализу биоптатов регенерирующей ткани, забираемых через 10 и 15 сут после трансплантации. Контрольными служили раны, в которые трансплантировали матричные материалы без клеток («трансплантат без клеток»). Общий контроль ко всем вариантам был представлен «острой раной» без трансплантатов, где процессы восстановления и новообразования дермы проходили естественным путем. Дополнительно проверяли резорбцию указанных матриц в условиях *in vitro* в процессе культивирования на них клеток в течение 35 сут. В процессе культивирования клеток на всех опытных образцах в условиях *in vitro* в течение 35 сут не отмечено никакой резорбции матричных материалов. В опытных вариантах с пленками и в контроле «трансплантат без клеток» на сроках 10 и 15 сут следов пленочных матриц в ране не сохранилось и не обнаружено в биоптате, т. е. они полностью резорбировали в организме. Процессы ангио- и миогенеза в опытных вариантах протекают уже на ранних сроках (10 сут) и усиливаются к 15-м сут. Во всех опытных вариантах по сравнению с общим контролем (острая рана) отмечается слабое развитие воспалительных реакций. Это свидетельствует об отсутствии токсичности матричных материалов и о нормально идущих процессах восстановления дермы.

Таким образом, испытанные матрицы с культивированными на них дермальными клетками в течение 15 сут полностью или частично резорбируются в организме лабораторных животных.

#### ОЦЕНКА ПРИМЕНИМОСТИ ШИРОКОПОРИСТЫХ АГАРОЗНЫХ КРИОГЕЛЕЙ В КАЧЕСТВЕ НОСИТЕЛЕЙ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ И ТРАНСПЛАНТАЦИИ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК.

© О. В. Паюшина,<sup>1</sup> Н. Н. Буторина,<sup>1</sup> Т. М. Никонова,<sup>1</sup> Е. И. Домарацкая,<sup>1</sup> В. И. Старостин,<sup>1</sup> Л. Г. Даммикал,<sup>2</sup> В. И. Лозинский.<sup>2</sup> <sup>1</sup> Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН, payushina@mail.ru, и <sup>2</sup> Институт элементарных соединений им. А. Н. Несмеянова РАН, Москва.

Создание трансплантатных аналогов скелетных тканей путем культивирования мезенхимных стромальных клеток (МСК) на трехмерных носителях является актуальным направлением тканевой инженерии. Один из классов потенциальных носителей для создания подобных конструкций — полимерные криогели. Их преимущества состоят в широкопористой морфологии, благоприятствующей зарастанию тканью, и возможности варьирования химического состава поверхности макропор. Цель настоящего исследования состояла в оценке пригодности криогелей на основе агарозы для культивирования МСК крысы и их совместимости с организмом животных-реципиентов. МСК выделяли из костного мозга половозрелых крыс или печени 16-суточных плодов. Криогели культивировали с  $2.4 \cdot 10^5$ — $1.5 \cdot 10^6$  клеток в течение 3—28 сут, после чего фиксировали для приготовления срезов либо трансплантировали в почку и под кожу крыс на 35 сут. Анализ срезов носителей показал слабую

способность криогеля из немодифицированной агарозы обеспечивать адгезию МСК. После 3—10 сут культивирования с МСК из печени плодов на поверхности и в порах этого носителя присутствовали немногочисленные, как правило нераспластавшиеся, клетки. Более продолжительное (21—28 сут) культивирование сопровождалось их откреплением и/или гибелью. Модификация носителя прививкой алкильных групп из 8 или 12 атомов углерода не способствовала лучшему прикреплению и росту МСК. Более перспективным путем к улучшению адгезивных свойств агарозного криогеля представляется включение в его состав желатины. При культивировании МСК зародышевой печени на криогелях из агарозы с 1.5 или 2.5 % привитой желатины большинство клеток распластывалось по стенкам пор, тогда как на носителе с 0.5 % желатины они сохраняли округлую форму. При этом степень заселения носителя клетками прямо зависела от концентрации желатины в его составе. Тенденция к стимулирующему влиянию желатины на адгезию МСК наблюдалась и при культивировании клеток костного мозга на криогелях из смеси агарозы с желатиной в различных соотношениях. По количеству и степени распластывания клеток носители с наибольшим содержанием желатины были сравнимы с коллагеновым криогелем. При трансплантации крысам криогели из агарозы с привитой желатиной зарастали богато васкуляризованной соединительной тканью без признаков воспаления. Результаты свидетельствуют о нетоксичности криогелей на основе агарозы и их способности обеспечивать проникновение клеток и вращание кровеносных сосудов в носитель. Это делает их перспективными материалами для тканевой инженерии, однако невысокая эффективность адгезии МСК к агарозному криогелю требует модификации его поверхностных свойств и (или) совершенствования методов засева клетками.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 07-04-12025 и 08-04-12049) и гранта президента РФ «Ведущие научные школы» (НШ-1134.2008.4).

СИНХРОННАЯ РЕПЛИКАЦИЯ ГОМОЛОГИЧНЫХ ХРОМОСОМ В ГИБРИДАХ МЕЖДУ ЭМБРИОНАЛЬНЫМИ СТВОЛОВЫМИ И СОМАТИЧЕСКИМИ КЛЕТКАМИ © О. Л. Подрядчикова, И. Е. Пристяжнюк, Н. М. Матвеева, О. Л. Серов. Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, olgapodr@yandex.ru.

Гибридные клетки, полученные слиянием эмбриональных стволовых (ЭС) и соматических клеток, имеют высокий уровень плюрипотентности и многие характеристики, свойственные ЭС-клеткам. Более того, такие гибридные клетки рассматриваются как эффективный способ перепрограммирования генома соматического партнера. Механизмы репрограммирования остаются во многом малоизученными, но, несомненно, сопровождаются глобальным или локальным ремоделированием хроматина и изменением статуса метилирования ДНК. В связи с этим встает вопрос: каков характер репликации гомологов в гибридных клетках такого типа и может ли он служить хромосомным индикатором репрограммирования? Учитывая, что гомологи хромосом происходят от разных партнеров по слиянию, изначально имевших разный статус дифференцировки и разную длину клеточного цикла, представляет несомненный интерес выяснить, сохраня-



ются или нет эти различия в репликации гомологов в гибридных клетках типа ЭСК—соматическая клетка.

В настоящее время для визуализации репликации эффективно используется флуоресцентная *in situ*-гибридизация (FISH) меченых зондов ДНК большого размера (фаги, космиды, ВАС-клоны). Метод основан на подсчете количества флуоресцентных сигналов, детектируемых в интерфазных ядрах, причем наличие одинарного сигнала (S, single dot) свидетельствует о том, что репликация в этом участке хромосомы отсутствует, тогда как присутствие двух близко расположенных сигналов (D, double dot) свидетельствует о репликации в изучаемом районе хромосомы. Другой уникальной особенностью метода *in situ*-гибридизации на интерфазных ядрах является возможность визуализировать асинхронность репликации аллелей или локальных районов в гомологичных хромосомах. В этом случае в ядре на одном гомологе выявляется одинарный сигнал, тогда как на другом — двойной. Нам представлялось перспективным использовать *in situ*-гибридизацию для визуализации репликации гомологичных хромосом в гибридных клетках, полученных слиянием ЭС-клеток с соматическими. Для анализа были выбраны пять субклонов клона НМС29. Клетки клонов серии НМС получены слиянием ЭСК линии НМ-1 *Mus. musculus* и спленоцитов *M. caroli*. В большинстве клонов этой серии в процессе культивирования наблюдалась потеря хромосом соматического партнера по слиянию. Однако в некоторых клонах происходила двухсторонняя сегрегация хромосом обоих родителей, наиболее выраженная в клоне НМС29. В результате клон имеет околодиплоидный состав хромосом (40—45) и восемь хромосом представлены двумя гомологами от разных родителей. Это хромосомы 2, 3, 5, 10, 16, 18, 19 и X. Пять хромосом представлены только гомологами *M. musculus* (хромосомы 4, 6, 7, 9, 15 и 17). Из индивидуальных клеток клона НМС29 была получена серия субклонов, имеющих околодиплоидный, вариативный хромосомный состав. Так, в клетках четырех субклонов содержалось по два гомолога хромосомы 3, причем один из них происходил от плюрипотентного партнера по слиянию (*M. musculus*), а второй — от соматического (*M. caroli*). Анализ репликации хромосомы 3 с помощью FISH на интерфазных ядрах клеток субклонов НМС29-3, НМС29-4, НМС29-5 и НМС29-7 не выявил достоверных различий в характере распределения синхронных и несинхронных сигналов с гомологичных хромосом в сравнении с данными по диплоидным клеткам (ЭСК линии НМ-1 и эмбриональные фибробласты). Полученные результаты позволяют предполагать, что репликация двух гомологов разного происхождения в гибридных клетках происходит синхронно.

Работа была проведена при финансовой поддержке Интеграционных проектов СО РАН № 5.2 и 14.2.

#### ЭКСПРЕССИЯ МАРКЕРОВ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ КЛЕТОК В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК ЯИЧНИКА.

© А. М. Полстяной,<sup>1,2</sup> А. В. Еремеев,<sup>1,2</sup> Г. Н. Полстяная,<sup>1,2</sup> Ю. И. Шеина,<sup>1,2</sup> А. В. Светлаков.<sup>1,2</sup> <sup>1</sup> ГОУ ВПО Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого Росздрава и <sup>2</sup>ООО «Центр репродуктивной медицины», Красноярск.

Бесплодие является актуальной проблемой современного здравоохранения. Прямая угроза воспроизводства

населения появляется в случае, если 15 % супружеских пар в популяции бесплодны. В нашей стране, по данным О. С. Филлипова, количество бесплодных супружеских пар составляет от 18 до 20 %. Несмотря на значительные успехи в этой области медицины, не все формы женского бесплодия корректируются достаточно эффективно. К таким этиологическим типам можно отнести бесплодие, обусловленное ранним истощением фолликулярного запаса, и синдром Сэвиджа. Лечение бесплодия с использованием донорских клеток не всегда является приемлемым для пациентов, так как далеко не каждая семейная пара готова принять генетически неродного ребенка. Кроме того, донорство яйцеклеток — сложный и трудоемкий процесс, негативно влияющий на организм донора. Одним из ключей к решению данной проблемы могут стать стволовые клетки (СК). На сегодняшний день показана возможность получения гаметопоподобных клеток из эмбриональных СК. До недавнего времени считалось, что все женские особи рождаются с заданным количеством гамет и в течение жизни новые не образуются. В экспериментах с культурами стволовых клеток мыши в лабораторных условиях был продемонстрирован оогенез, а в яичниках мышей и приматов были выявлены митотически активные герминальные клетки. На основании этого было выдвинуто предположение о наличии СК в яичниках человека. Тем не менее до сих пор не была выделена культура СК из яичников. Столь противоречивые результаты исследователей не позволяют сделать окончательный вывод о наличии или отсутствии СК в ткани яичников взрослых женщин. В этой связи целью нашего исследования стал поиск клеток с характеристиками СК, экспрессирующих соответствующие маркеры в тканях яичников женщин в репродуктивном возрасте.

В результате проведенных экспериментов из 5 кусочков ткани яичника от пяти пациенток были получены различные по клеточному составу культуры. Тип клеток в культуре во многом зависел от вида культуральной среды и адгезионных компонентов, использованных при культивировании. В культурах, выращенных на средах DMEM/F12 как на желатиновом матриксе, так и на Матригеле с добавлением 10 % ЭТС, клетки экспрессировали маркеры CD90 и CD105. Основную массу составляли клетки с характерной фибробластоподобной морфологией. Пассирование проводилось в среднем 1.5—2 мес. К концу этого времени клетки в культуре подвергались полиплоидизации, фрагментации цитоплазмы и конечной дегенерации (в среднем 5—7 пассажей). Экспрессию маркеров (SSEA3-4, c-kit, cyt-19, tra-80, CD30 и klf-4), характерных для СК в данных культурах, выявить не удалось. В культурах, полученных с помощью среды mTeSR с добавлением заменителя сыворотки, были получены клетки, экспрессирующие маркеры, характерные для СК (SSEA3-4, c-kit, tra-80, cd30 и klf-4). Эти клетки были организованы в колонии размером около 300—400 мкм. Клетки были округлой формы с небольшим количеством коротких отростков, достаточно крупным ядром и небольшим количеством цитоплазмы. Однако помимо этого была выявлена и экспрессия мезенхимных маркеров CD90 и CD105. Это свидетельствует в пользу существования в тканях яичника СК мезенхимного происхождения. Культура имеет нормальный кариотип 46XX и сохраняет хромосомную и морфологическую стабильность уже на протяжении 7 мес культивирования. Могут ли эти клетки быть предшественниками гамет, покажут последующие исследования. Также неизвестно, какую роль играют эти

клетки в яйчнике. Можно предположить, что эти клетки участвуют в репаративных процессах после овуляции — способствуют заживлению белочной оболочки яйчника. Также небезынтесным является изучение возможности дифференцировки данных клеток.

**РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ВЫДЕЛЕНИЯ И КУЛЬТИВИРОВАНИЯ АУТОЛОГИЧНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЖИРОВОЙ ТКАНИ ДЛЯ УВЕЛИЧЕНИЯ ОБЪЕМА УТЕРЯННОГО КОСТНОГО СУБСТРАТА.**  
© К. А. Рубина,<sup>1</sup> В. Ю. Сысоева,<sup>1</sup> Н. И. Калинина,<sup>1</sup> И. Ю. Чаусская,<sup>2</sup> А. Ю. Дробышев.<sup>2</sup> <sup>1</sup> Факультет фундаментальной медицины Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова и <sup>2</sup> Кафедра госпитальной хирургической стоматологии и челюстно-лицевой хирургии Московского государственного медико-стоматологического университета, rkсениya@mail.ru, veroniks@mail.ru.

Проблема реабилитации пациентов с дефектами челюстных костей остается одной из самых актуальных задач стоматологии на сегодняшний день. Известно, что существует группа пациентов, протезирование у которых затруднено, а в ряде случаев невозможно из-за выраженной утраты альвеолярной кости. У таких пациентов после удаления зубов в результате воспалительно-деструктивных процессов в пародонте происходит остеокластическая резорбция, которая заканчивается неполноценным ремоделированием кости, что неизбежно приводит к атрофии альвеолярного гребня и дефектам костной ткани.

Известно, что стромальные клетки жировой ткани (СКЖТ) имеют высокий ангиогенный потенциал. Ангиогенное действие СКЖТ основано на их способности секретировать факторы роста, в том числе фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) и фактор роста гепатоцитов (HGF). Кроме того, введение СКЖТ в зону повреждения активирует репаративные процессы за счет активации локальной пролиферации эндотелиальных клеток и стимуляции выхода эндотелиальных предшественников из костного мозга. Активированные эндотелиальные клетки мигрируют в область повреждения и принимают участие в формировании новых сосудов. Кроме того, известно, что СКЖТ содержат субпопуляцию клеток-предшественников, способных дифференцироваться в нескольких направлениях — эндотелиальном, хондрогенном, адипогенном и остеогенном. Таким образом, описанные свойства СКЖТ позволяют предполагать, что эти клетки являются перспективными для использования в клеточной терапии в стоматологии для стимуляции репаративных процессов и наращивания утраченного костного субстрата.

В работе были использованы СКЖТ человека, выделенные и культивированные в среде, поддерживающей рост недифференцированных мезенхимных клеток, с добавлением 10 % аутологичной сыворотки. При этом оценивали пролиферативные и апоптотические характеристики получаемой клеточной популяции в описанных условиях культивирования. Клетки, культивированные в присутствии аутологичной сыворотки, также тестировали на способность дифференцироваться в четырех направлениях — остеогенном, эндотелиальном, адипогенном и хондрогенном. Кроме того, в данной работе были отработаны условия для культивирования СКЖТ на носителях — коллапане и гидроксиапатите с целью дальнейшего применения в стоматологии.

**ПОЛУЧЕНИЕ КЛЕТОЧНЫХ КОЛОНИЙ С ФЕНОТИПОМ, ПОДОБНЫМ ЭМБРИОНАЛЬНЫМ СТВОЛОВЫМ ИЗ СПЕРМАТОГЕННЫХ КЛЕТОК ХРЯКОВ, IN VITRO.** © И. П. Савченкова. Всероссийский государственный научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. Я. Р. Коваленко РАСХН, Москва, s-ip@mail.ru.

Половые клетки — это высокоспециализированная клеточная популяция, которая несет ответственность за передачу генетической информации и предназначена для продолжения и эволюции видов. Накапливаются достоверные данные, свидетельствующие о возможности развития из эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) мыши половых клеток *in vitro*. Высказывается предположение о том, что процесс дифференцировки ЭСК в гаметы — это обратный процесс. Мы получили результаты, согласующиеся с данным мнением. В процессе культивирования сперматогоний типа А хряка нами были получены колонии с фенотипом, подобным ЭСК. Для получения культур сперматогенных клеток использовали семенники от половозрелых помесных хряков. Кастрацию проводили под анестезией. После декапсуляции тестикулы подвергали механической, а затем ферментативной обработке. Для очистки сперматогоний от других клеточных типов использовали методический прием, основанный на разных адгезивных способностях клеток (Савченкова и др., 2000). В качестве фидерных слоев использовали линию перевиваемых эмбриональных фибробластов мыши STO и клетки Сертоли, выделенные из тестикул 4-месячных хряков. Средой для культивирования сперматогоний была среда, используемая для культивирования ЭСК мыши (Савченкова, 1996). Ранее проведенные нами гистологические исследования показали, что оптимальным сроком для получения обогащенной культуры сперматогоний типа А являются 60—80 сут после рождения хряка. Так как мы не имели возможности идентифицировать стволовые сперматогонии типа A<sub>0</sub> с помощью специфических маркеров, предполагается, что полученная суспензия могла быть представлена как стволовыми сперматогониями типа A<sub>0</sub>, так и, возможно, их более коммитированными формами (A<sub>1</sub>—A<sub>4</sub>). Наличие в культуре стволовых клеток было подтверждено функциональным тестом посредством переноса изолированных клеток в семенник хряков-реципиентов. Выделенные клетки показали способность возобновлять экзогенный сперматогенез в семенных канальцах хряков в течение 1 мес (Савченкова и др., 2006). При культивировании сперматогенных клеток мы столкнулись с рядом трудностей. Без фидерного слоя сперматогонии сохраняли свою жизнеспособность только на протяжении 24—48 ч. Культивирование сперматогенных клеток на фидерных слоях позволило поддерживать клетки в течение 7—10 сут. На фидерном слое, представленном STO, были получены клеточные колонии с четко очерченными границами, в которых визуализировались мелкие плотно упакованные клетки, по морфологии напоминающие колонии ЭСК. Полученные колонии клеток не окрашивались на щелочную фосфатазу. Клонирование этих колоний на новые фидерные слои с целью расширения клеточной популяции и добавление в ростовую среду LIF приводили в течение 3—4 нед к формированию колоний, которые имели морфологию, подобную ЭСК, и отличались высокой активностью щелочной фосфатазы. Таким образом, результаты проведенных нами исследований показали, что клеточная популяция, обогащенная спермато-



гониями типа А хряка, может быть источником для получения *in vitro* колоний с фенотипом, подобным ЭСК. Это открывает новые перспективы для получения ЭСК крупных сельскохозяйственных животных (лошадь, крупный рогатый скот), у которых существует проблема дефицита биологического материала — предимплантационных зародышей.

### Список литературы

Савченкова И. П., Коржикова С. В., Костерева Н. В., Эрнст Л. К. 2006. Культивирование и трансплантация сперматогоний типа А хряков. Онтогенез. 37 (4) : 292—300.

Савченкова И. П., Приданцева Т. А., Сергеев Н. И., Эрнст Л. К. 2000. Выделение примордиальных половых клеток из зародышей мышей и их очистка. С.-х. биология. 2 : 119—122.

Савченкова И., Фляйшман М., Булла Й., Брэм Г. 1996. Использование эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) мыши для получения химерных животных. Цитология. 38 (10) : 1118—1123.

СРАВНЕНИЕ ОСТЕОИНДУКТИВНЫХ СВОЙСТВ РЯДА БИОМАТЕРИАЛОВ И ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ С АУТОЛОГИЧНЫМИ МУЛЬТИПОТЕНТНЫМИ МЕЗЕНХИМНЫМИ СТРОМАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ НА ИХ ОСНОВЕ. © Н. С. Сергеева,<sup>1</sup> И. К. Свиридова,<sup>2</sup> С. М. Баринов,<sup>1</sup> Г. А. Франк,<sup>1</sup> В. А. Кирсанова,<sup>1</sup> С. А. Ахмедова,<sup>2</sup> В. С. Комлев,<sup>2</sup> И. В. Фадеева,<sup>1</sup> И. В. Мыслевцев,<sup>2</sup> А. Ю. Федотов. <sup>1</sup> ФГУ «Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П. А. Герцена Росмедтехнологий», prognos.06@mail.ru, и <sup>2</sup> Учреждение РАН «Институт металлургии и материаловедения им. А. А. Байкова», Москва.

Логическим продолжением использования различных 3D-биоматериалов с остеозамещающими потенциями является создание на их основе тканеинженерных конструкций (ТКИК), эволюция которых в организме больного-реципиента могла бы привести к восстановлению как структурной, так и функциональной целостности костной ткани. Целью работы было сравнение остеоиндуктивных свойств биоматериалов (гидроксиапатит (ГА), карбонат-гидроксиапатит (КГА), хитозан-карбонатгидроксиапатит (Хит-КГА), скелет натуральных кораллов (НК) сем. *Acropora*) и ТКИК на их основе (аутологичные мультипотентные мезенхимные стромальные клетки ММСК, иммобилизованные на соответствующем биоматериале — матриксе) у мелких и крупных лабораторных животных.

Остеоиндуктивные потенции материалов изучали на моделях остеотомии голени крыс линии Wistar и сегментарной резекции бедренной кости баранов. ММСК выделяли из костного мозга животных и культивировали в пассажах по стандартной методике. ТКИК формировали путем префабрикации (7—10 сут) *in vitro* 3D-материалов с ММСК 2—3 пассажей. Костные дефекты у крыс заполняли гранулами биоматериала (300—600 мкм) или ТКИК на их основе. Резецированный сегмент бедренной кости барана замещали единым имплантатом из биоматериала или ТКИК на его основе. Имплантаты у баранов дополнительно укрепляли титановыми пластинами. Всем животным в динамике наблюдения (до 12 мес — крысы и до 6 мес — бараны) производили рентгенологические и морфологические исследования зоны операции.

Установлено, что все испытанные биоматериалы обладали остеоиндуктивными свойствами и постепенно замещались костной тканью в зоне дефекта. У крыс по скорости биорезорбции, остеозамещающим потенциям и способности к интеграции с окружающими тканями в реципиентном ложе они представляли следующий ряд: НК>Хит-КГА>КГА>ГА; при этом лишь НК-имплантаты полностью замещались костной тканью. При имплантации ТКИК репаративный остеогенез протекал более интенсивно за счет активации не только периостального, но и энхондрального механизма, что приводило к формированию органотипически зрелой костной ткани.

Все изученные биоматериалы обладают остеоиндуктивными свойствами разной степени выраженности. Более активное формирование костной ткани *de novo* в зоне дефекта при использовании в качестве имплантата ТКИК на основе биоматериалов и аутологичных ММСК (в сравнении с биоматериалами без клеток) обусловлено реактивацией энхондрального остеогенеза дополнительно к периостальному.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ТРАНСПЛАНТАЦИИ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ НЕЙРОКЛЕТОК ОБОНЯТЕЛЬНОЙ ЛУКОВИЦЫ И ИМПЛАНТАЦИИ СИНТЕТИЧЕСКОГО МАКРОПОРИСТОГО ГИДРОГЕЛЯ ПРИ ТРАВМЕ СПИННОГО МОЗГА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ. © В. М. Семенова, В. И. Цымбалюк, В. В. Медведев, Ю. Я. Яминский, Л. П. Стайно. ГУ «Институт нейрохирургии им. акад. А. П. Ромоданова АМН Украины», Киев.

Восстановительное лечение травмы спинного мозга является актуальной проблемой в связи с неуклонным ростом этой патологии среди больных работоспособного возраста, приводящей к их инвалидизации. С целью повышения эффективности традиционного нейрохирургического лечения таких больных в настоящее время разрабатываются возможные варианты трансплантации в очаг повреждения культивируемых нейроклеток из различных источников, а также способы имплантации синтетических или полусинтетических матриц, обладающих сложной трехмерной структурой и обеспечивающих правильную пространственную организацию репаративных тканевых процессов в зоне травмы.

Цель работы — изучить влияние изолированной и комбинированной имплантаций синтетического гидрогеля и аллогенной трансплантации клеток обонятельной луковицы (ТКОЛ) на регенерационные процессы в спинном мозге половозрелых крыс после моделирования его левостороннего половинного пересечения (ЛПП) в нижнегрудном отделе.

Экспериментальные группы животных: I — группа сравнения — моделирование ЛПП спинного мозга ( $n = 24$ ); II — группа «гидрогель»: имплантация синтетического гидрогеля (поли[N-(2-гидроксипропил)-метакриламид]; лаборатория E. Pinet, FISO Technologies Inc., Квебек, Канада) в зону ЛПП непосредственно после нанесения травмы ( $n = 37$ ); III и IV группы — введение суспензии культивированных клеток обонятельной луковицы (ОЛ) в ткань спинного мозга через 4 ( $n = 12$ ) и 8 ( $n = 8$ ) нед после имплантации гидрогеля. Клетки выделяли из ОЛ половозрелых крыс и культивировали в присутствии факторов роста hEGF и hFGF. Учет результатов проводили согласно шкале двигательной активности D. M. Basso, M. S. Beattie и J. C. Bresnahan (BBB) и методом электро-

нейромиографии. Во всех экспериментальных группах проводили светооптический и электронно-микроскопический контроль динамики структурных изменений спинного мозга.

При культивировании нейроклеток из ОЛ в присутствии митогенов hEGF и hFGF наблюдалась пролиферация недифференцированных нейроклеток с минимальным фенотипом, формирующих колонии и компактные сфероидные микроагрегаты из вивентин-положительных прогениторных нейроклеток. На 16-й нед после имплантации гидрогеля без нейроклеток отмечалось достоверное улучшение функции задних конечностей на 2.00—2.44 балла по шкале BBB в сравнении с животными, перенесшими изолированное ЛПП. При изолированной имплантации гидрогеля формировалась четырехфазная динамика показателей электрической активности: фаза роста (1—7 нед), стабилизация (7—23 нед), пик и регрессия (26—32 нед). Проведение ТКОЛ через 4 нед после имплантации гидрогеля сопровождалось достоверным пиком скорости роста функции задней ипсилатеральной конечности на 4—6 нед по отношению к группе сравнения, а также менее выраженным снижением величины максимальной амплитуды М-ответа исследуемой мышцы обеих задних конечностей, что указывает на неоднозначность влияния гидрогеля на изменение активности нейронального аппарата спинного мозга ниже уровня травмы. Выявленные особенности течения посттравматического процесса в спинном мозге экспериментальных животных во всех группах опытов коррелируют с динамикой патоморфологических изменений спинного мозга на светооптическом и электронно-микроскопическом уровнях.

Использование гидрогеля в предложенном варианте обеспечивает длительное и в целом положительное влияние на восстановительные процессы в спинном мозге. ТКОЛ, проведенная в отдаленном периоде посттравматического процесса, вызывает слабopоложительный функциональный эффект, который сопровождается снижением чрезмерной электрической активности в эфферентных отделах двигательной системы. Комбинированное применение имплантации гидрогеля и последующей ТКОЛ можно рассматривать как одно из перспективных направлений развития регенерационной тканевой нейроинженерии.

**РАННИЕ СТАДИИ ПЕРЕПРОГРАММИРОВАНИЯ ФИБРОБЛАСТОВ В ГЕТЕРО- И СИНКАРИОНАХ И ПРИ ИНДУКЦИИ В НИХ ПЛЮРИПОТЕНТНОСТИ С ПОМОЩЬЮ ТРАНСФЕКЦИИ ВЕКТОРАМИ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИМИ *Oct4/Sox2* И *Nanog/Lin28*.**  
© О. Л. Серов, А. А. Круглова, Н. М. Матвеева, М. А. Гридина, Е. А. Кизилова, Н. Р. Баттулин. Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, serov@bionet.nsc.ru.

Исследовали поведение генома фибробласта на ранних стадиях образования гетерокарионов и синкарионов при слиянии эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) с фибробластами и ранние стадии индукции плюрипотентности в фибробластах под действием транзиторной трансфекции их векторами, экспрессирующими *Oct4/Sox2* и *Nanog/Lin28*. В гибридных клетках типа ЭСК-фибробласт наблюдается перепрограммирование генома соматического партнера (активация генов *Oct4* и *Nanog* и деметилирование промоторов этих генов), а сами гибридные клетки приобретают потенциал, сопоставимый с таковым ЭСК, т. е. плюрипотентность проявлялась как доминант-

ный признак. Изучение ранних стадий образования гетерокарионов (4—20 ч после слияния клеток) показало, что только 20 % слившихся клеток приобретают фенотип ЭСК (морфологически сходны с ЭСК, позитивные по *Oct4* и *Nanog*, в них наблюдается реактивация неактивной X-хромосомы, но все негативны по коллагену V типа), тогда как 80 % гетерокарионов имели многие характеристики фибробласта. В гетерокарионах типа ЭСК можно наблюдать активацию гена *Oct4* в ядре фибробласта через 8—20 ч после слияния. Анализ образования первичных колоний синкарионов показал, что клетки со сходной морфологией ЭСК формируют активно пролиферирующие колонии к 3—4-м сут после слияния, тогда как гибридные клетки фибробластного типа утрачивают пролиферативную активность и вскоре деградируют. Таким образом, перепрограммирование генома фибробласта происходит на стадии гетерокариона, на этой же стадии происходит выбор «судьбы» — пойдет развитие по пути ЭСК или фибробласта, т. е. «судьба» гетерокариона дуалистична. При индукции плюрипотентности в фибробластах человека (технология получения iPS-клеток) под действием транзиторной трансфекции плазмидами, экспрессирующими *Oct4/Sox2* и *Nanog/Lin28*, мы наблюдали изменение морфологии фибробластов, в результате чего они приобретали сходство с ЭСК на 4—5-е сут после обработки клеток-мишеней. Через 14—16 сут после транзиторной трансфекции нами были выявлены колонии, содержащие типичные ЭСК человека, позитивные по *Oct4* и *Nanog*. Следует также отметить, что часть первичных колоний утрачивала пролиферативную активность и деградировала. Предполагается, что это результат неполного репрограммирования генома клеток-мишеней. Анализ динамики появления iPS-клеток показал, что перепрограммирование фибробластов происходит либо до первого митоза, либо вскоре после его завершения, т. е. имеет сходство с процессами перепрограммирования, протекающими в гетерокарионах.

**ВЛИЯНИЕ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ СРЕДЫ, КОНДИЦИОНИРОВАННОЙ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ ЛИНИИ EA.hy 926, НА СВОЙСТВА СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА КРЫСЫ.** © О. Е. Сидоренко,<sup>1</sup> Ю. В. Вилкова,<sup>2</sup> Э. А. Старикова,<sup>3</sup> С. А. Александрова,<sup>1</sup> Г. П. Пинаев.<sup>1</sup> <sup>1</sup> С.-Петербургский государственный политехнический университет, <sup>2</sup> Институт цитологии РАН и <sup>3</sup> НИИ экспериментальной медицины СЗО РАМН, Санкт-Петербург.

Для участия в регенерационных процессах стромальные клетки костного мозга (СККМ) должны мигрировать из костного мозга в кровеносное русло и далее в участок повреждения. Эти процессы сопровождаются тесным взаимодействием СККМ с эндотелиальными клетками (ЭК), что может приводить к изменению свойств мигрирующих клеток. Целью настоящей работы явилось изучение влияния секреторных продуктов эндотелиальных клеток на поверхностный фенотип, способность к клонообразованию, пролиферации, миграции и дифференцировке в ортодоксальных направлениях. В работе были использованы СККМ беспородных крыс 6-месячного возраста. Оценивали свойства СККМ после инкубации этих клеток в αMEM с 10 % ЭТС (контроль) и после инкубации в такой же культуральной среде, кондиционированной ЭК линии EA. hy 926. Уровень экспрессии поверхностных маркеров определяли с помощью проточной цитометрии.



Количество колониеобразующих единиц подсчитывали микроскопически. Для оценки влияния кондиционированной ЭК среды на миграцию СККМ использовали модель «раны». Интенсивность пролиферации определяли методом, основанным на окраске внутриклеточного белка кристаллическим фиолетовым. Способность к дифференцировке СККМ исследовали с помощью специфических гистохимических окрасок — жировым красным (в случае адипоцитарной) и реакцией Ван Косса (в случае остеогенной) после культивирования в дифференцировочных средах. Предварительно проводили изучение поверхностного фенотипа СККМ крысы на разных этапах культивирования. Наши исследования показали, что приблизительно 70 % свежeweделенных из костного мозга мононуклеарных клеток экспрессировали маркер гемопоэтических клеток CD45 и 15 % клеток — маркер стромальных стволовых клеток CD90. В процессе культивирования происходило закономерное снижение числа клеток, экспрессирующих CD45, при одновременном увеличении числа клеток, экспрессирующих CD90. Уже на 2-м пассаже 90 % клеток экспрессировали CD90 и только 2 % — CD45, что полностью согласуется с данными литературы. Инкубация СККМ в кондиционированной ЭК среде приводила к двукратному усилению уровней экспрессии CD90 и CD29, участвующих в процессах адгезии и миграции. Кроме того, было показано, что СККМ, культивировавшиеся в кондиционированной ЭК среде, давали на порядок больше клонов по сравнению с СККМ, растущими в стандартных условиях. Также инкубация СККМ в кондиционированной среде приводила к достоверному по сравнению с контролем ускорению сокращения площади «раны» в среднем на 12—15 %, что являлось показателем усиления миграционной активности этих клеток. В обоих вариантах культивирования клетки активно вступали в остеогенную и адипоцитарную дифференцировки, однако количество адипоцитов в опыте было значительно меньше. Секреторные продукты ЭК, находящиеся в кондиционированной среде, не влияли на пролиферацию СККМ. Полученные в данной работе результаты показали, что секреторные продукты ЭК усиливают экспрессию поверхностных молекул CD90 и CD45, способность СККМ к клонообразованию и миграции. Важно выяснить в дальнейшем, какие факторы, секретируемые ЭК, способствуют изменению свойств СККМ.

**ТРАНСПЛАНТАЦИЯ Lin(–) СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА ДИКОГО ТИПА УЛУЧШАЕТ ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ ПОПЕРЕЧНОПОЛОСАТЫХ МЫШЕЧНЫХ ВОЛОКОН МУТАНТНЫХ МЫШЕЙ mdx.** © А. В. Соколова, В. В. Зенин, В. М. Михайлов. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

В настоящее время внимание исследователей привлекает изучение участия стволовых клеток в процессах регенерации и дифференцировки, имеющих место в поврежденных тканях и органах. При изучении дифференцировки поперечнополосатых мышечных волокон (ППМВ) мутантных мышей mdx с нарушенным синтезом дистрофина показано, что после внутримышечной трансплантации стволовых клеток костного мозга (СККМ), экспрессирующих зеленый флуоресцентный белок (GFP), наблюдаются включение СККМ в мышечные волокна и усиление синтеза дистрофина. Представляет интерес более детальный анализ развития дифференцировочных

событий в мышцах мутантных мышей mdx после трансплантации СККМ дикого типа. В работе использовали популяцию Lin(–) СККМ.

Для приготовления СККМ Lin(–) костный мозг нормальных мышей C57BL/6 истощали от дифференцированных клеток гемопоэтического ряда магнитным способом на системе Dynal (Norway) смесью антител против антигенов CD3, CD4, CD8, CD38, CD45R, Ter119, Ly-6G и F4/80 (Caltag, США). Полученные СККМ Lin(–) инъецировали в 8—9 точек M. quadriceps femoris мышей mdx в дозе  $(0.5\text{—}1.0) \cdot 10^6$  клеток на мышцу. Исследования мышц производили через 4, 8, 16 и 24 нед после трансплантации. На срезах мышц определяли долю ППМВ без центрально расположенных ядер, долю погибших ППМВ и долю ППМВ, экспрессирующих дистрофин. Для исследования структуры нейромышечных соединений (НМС) продольные и поперечные срезы мышц окрашивали тетраметилродамином- $\alpha$ -бунгаротоксином (Biotium, США), который специфически связывается с ацетилхолиновыми рецепторами. Препараты исследовали на конфокальных микроскопах LSM 5 PASCAL (Carl Zeiss) и Leica (Leica Microsystems).

Известно, что из-за отсутствия дистрофина в ППМВ мышей mdx развивается окислительный стресс, который является причиной гибели ППМВ, достигшей в наших опытах  $2.2 \pm 0.6$  %. Через 4 нед после трансплантации СККМ Lin(–) наблюдалось снижение доли погибших ППМВ до  $1.0 \pm 0.2$  %. Доля ППМВ без центральных ядер достоверно возрастала, начиная с 8 нед. Доля ППМВ, содержащих дистрофин, достоверно увеличивалась по сравнению с контролем только через 16 нед после трансплантации с  $0.47 \pm 0.09$  до  $1.5 \pm 0.2$  %, и это увеличение сохранялось на сроке наблюдения в 24 нед. Также происходило улучшение структуры НМС. Через 4 нед после трансплантации в мышцах мышей mdx площадь НМС на поперечных срезах мышц увеличилась с  $78.4 \pm 5.1$  до  $106.9 \pm 3.4$  мкм<sup>2</sup>, что соответствует площади НМС нормальных мышей C57BL/6 —  $102.8 \pm 3.0$  мкм<sup>2</sup>. Увеличенные площади НМС у мышей mdx после трансплантации СККМ сохранялись на всех последующих сроках наблюдения. На продольных срезах было зарегистрировано увеличение площади отдельных кластеров ацетилхолиновых рецепторов, составляющих НМС, с  $58.0 \pm 3.9$  до  $80.0 \pm 4.9$  мкм<sup>2</sup>. Одновременно происходило уменьшение количества кластеров ацетилхолиновых рецепторов, составляющих НМС, с  $4.7 \pm 0.3$  до  $3.7 \pm 0.1$ . Таким образом, СККМ Lin(–) дикого типа вызывают изменение структуры НМС скелетных мышц у мутантных мышей mdx, приближая ее к структуре НМС нормальных ППМВ. Обращает на себя внимание, что события дифференцировки ППМВ у мутантных мышей mdx после однократного введения СККМ Lin(–) дикого типа развиваются в определенной последовательности. В первую очередь уменьшается уровень гибели ППМВ и улучшается структура НМС. На более поздних сроках наблюдения увеличивается доля ППМВ, не имеющих центрально расположенных ядер. Увеличение доли ППМВ, экспрессирующих дистрофин, происходит позднее всего. Результаты обсуждаются с точки зрения конкурентных взаимоотношений трансплантированных стволовых клеток дикого типа и предсуществующих в мышцах мутантных стволовых клеток, обеспечивающих регенерацию и дифференцировку ППМВ мышей mdx.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект-

ты 05-04-49609 и 06-04-08388офи) и контракта ГК № 02.512.11.2219 Федерального агентства по науке и инновациям.

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ СОВМЕСТНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МОНОЦИТОВ И ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ИХ ВЗАИМНОГО ВЛИЯНИЯ.** © Э. А. Старикова, И. С. Фрейдлин. НИИ экспериментальной медицины СЗО РАМН, Санкт-Петербург.

Разработана экспериментальная модель, которая позволяет в условиях совместного культивирования эндотелиальных клеток перевиваемой линии EA.Hy926 и клеток перевиваемых моноцитоподобных линии THP-1 проводить комплексное изучение взаимного влияния эндотелиальных и моноцитоподобных клеток, включая изучение взаимного влияния продуктов их секреции — цитокинов и хемокинов. Наиболее существенные изменения экспрессии поверхностных молекул на клетках моноцитоподобной линии THP-1 наблюдали при их трансэндотелиальной миграции через монослой эндотелиальных клеток линии EA.Hy926. Фенотипические изменения оценивали, проводя сравнение уровней экспрессии поверхностных молекул на клетках THP-1, которые мигрировали в отсутствие монослоя эндотелиальных клеток или трансмигрировали через монослой эндотелиальных клеток. Молекулы CD11b, HLA-DR и CD14 конститутивно экспрессировались на клетках THP-1. Трансэндотелиальная миграция приводила к изменению фенотипа клеток линии THP-1, что выражалось в достоверном повышении уровней экспрессии молекул CD11b и HLA-DR. Уровень экспрессии исследуемых маркеров на клетках THP-1, которые не прошли трансэндотелиальной миграции (остались над монослоем эндотелиальных клеток), не отличался от уровня экспрессии этих маркеров на интактных клетках THP-1. В процессе трансэндотелиальной миграции мы изучали изменения секреции цитокина IL-6 и хемокинов IL-8, RANTES, MCP-1 и IP-10, которые, согласно данным литературы, могут секретироваться и эндотелиальными клетками, и моноцитами. В условиях трансэндотелиальной миграции клетками секретировались все изученные хемокины и IL-6. При этом секреция IP-10 и RANTES проявлялась только при трансэндотелиальной миграции в отличие от монокультуры клеток THP-1, концентрация IL-6 не изменялась, концентрация IL-8 снижалась незначительно, а концентрация MCP-1 была в 10 раз ниже, чем в монокультуре клеток THP-1. При изучении «цитокинового окружения» клеток, формирующегося в условиях совместного культивирования эндотелиальных и моноцитоподобных клеток, были выявлены существенные изменения. В связи с этим встал вопрос о возможности влияния цитокинов на свойства моноцитоподобных клеток THP-1. Для этого сравнивали свойства клеток THP-1, которые трансмигрировали через интактный монослой эндотелиальных клеток или через монослой эндотелиальных клеток в присутствии цитокинов TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  и IL-4. Трансэндотелиальная миграция в присутствии TNF $\alpha$  и IFN $\gamma$  вызывала достоверно более сильные изменения уровней экспрессии всех исследуемых маркеров по сравнению с уровнями экспрессии этих же маркеров на клетках THP-1, которые трансмигрировали через интактный эндотелий, включая достоверное усиление экспрессии CD14, которая не изменялась в случае трансмиграции в отсутствие цитокинов.

В условиях трансмиграции в присутствии TNF $\alpha$  статистически достоверно возрастала секреция всех хемокинов, кроме RANTES. В присутствии TNF $\alpha$  секреция IL-8 и IL-6 возрастала в 3 раза. При трансмиграции в присутствии IFN $\gamma$  и IL-4 не изменялись уровни секреции IL-6, IL-8, RANTES и MCP-1. IL-4 оказывал статистически достоверное ингибирующее влияние на секрецию IP-10 по сравнению с уровнем, характерным для трансмиграции в отсутствие цитокинов.

Полученные результаты позволяют заключить, что при изучении взаимодействия двух типов клеток (эндотелиальных и моноцитоподобных) необходимо учитывать влияние их непосредственных контактов и продуктов их секреции.

**СТАРЕНИЕ ВЫЗЫВАЕТ ПОДАВЛЕНИЕ АНГИОГЕННЫХ СВОЙСТВ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЖИРОВОЙ ТКАНИ.** © Е. Е. Старостина, А. Ю. Ефименко, Н. И. Калинин, Е. В. Парфенова. Факультет фундаментальной медицины.

Среди мультипотентных мезенхимных стромальных клеток взрослого организма стромальные клетки жировой ткани (СКЖТ) считаются одними из самых перспективных для применения в клеточной терапии. Было показано, что они обладают способностью стимулировать рост кровеносных сосудов, в том числе путем секреции ангиогенных факторов роста. Однако различные факторы, включая возраст пациентов, могут оказывать влияние на их функциональные свойства. Поэтому целью нашей работы было оценить влияние возрастного фактора на пролиферацию, жизнеспособность и ангиогенную активность СКЖТ.

СКЖТ были выделены из жировой ткани мышей линии BalB/c, возраст животных составлял 2 мес (СКЖТмол,  $n = 9$ ) или 18 мес (СКЖТстар,  $n = 9$ ). Клетки культивировали до 2-го пассажа. Затем в течение 48 ч их выращивали в условиях 1 (гипоксия) или 20 % (нормоксия) содержания кислорода. Пролиферацию клеток оценивали с помощью коммерческого МТТ-теста (In-vitrogen). Длину теломер определяли с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени. Жизнеспособность клеток оценивали с помощью проточной цитофлуориметрии по связыванию аннексина-V и накоплению 7-аминоактиномицина D. Анализ изменения экспрессии генов проводили методом полимеразной цепной реакции в реальном времени. Ангиогенную активность суммарных продуктов секреции клеток оценивали по влиянию кондиционированной среды (КС) на образование капилляроподобных структур эндотелиальными клетками (HUVEC) на Матригеле in vitro.

СКЖТ старых животных обладают в 2 раза меньшим пролиферативным потенциалом по сравнению с клетками молодых животных. Длина теломер у клеток старых животных была в 3 раза меньше по сравнению с СКЖТ молодых мышей. Более того, в популяции СКЖТ старых животных доля клеток, находящихся на разных стадиях апоптоза, была в 3 раза больше по сравнению с клетками молодых животных. Содержание мРНК фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) и плацентарного фактора роста (PlGF) было статистически значимо больше в СКЖТмол, в то время как уровень фактора роста гепатоцитов (HGF) был выше в СКЖТстар. Гипоксия приводила к выравниванию содержания мРНК HGF в СКЖТмол и СКЖТстар. Экспрессия антиангиогенных факторов эндостатина и



тромбоспондина значимо не отличалась в клетках от животных разного возраста и в схожей степени снижалась в гипоксических условиях. Наблюдалось статистически значимое повышение факторов системы урокиназы (урокиназа, рецептор к урокиназе, металлопротеиназы 2-го и 9-го типов, ингибитор активатора плазминогена-1) в СКЖТстар по сравнению с СКЖТмол как в нормоксических, так и в гипоксических условиях. Суммарная длина капилляроподобных структур, образованных HUVEC на Матригеле в присутствии КС от СКЖТмол, была статистически значимо больше, чем от СКЖТстар, что свидетельствует о более выраженной секреции ангиогенных факторов клетками молодых животных. В клетках, культивированных в условиях гипоксии, способность стимулировать образование таких структур повышалась в равной степени.

Таким образом, при старении происходит подавление пролиферативной активности и жизнеспособности стромальных клеток жировой ткани, а также продукции ангиогенных факторов этими клетками. Однако стимуляция ангиогенного потенциала клеток под действием гипоксии не зависит от возраста, что указывает на то, что культивирование клеток перед трансплантацией в условиях пониженного содержания кислорода может повышать эффективность клеточной терапии.

**ИССЛЕДОВАНИЕ ДИНАМИКИ КЛЕТОЧНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ И РЕПАРАТИВНОЙ СПОСОБНОСТИ АСЦИДИИ *HALOCYNTHIA PURPUREA*. © А. Н. Сухачев, И. В. Кудрявцев, А. В. Полевщиков. ГУ НИИ экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург.**

Исследования защитных реакций асцидий приобретают все большую популярность благодаря их филогенетическому положению. Оболочники занимают промежуточное положение между позвоночными и беспозвоночными животными. В соответствии с этим иммунную систему оболочников можно рассматривать как предковую для эволюционно продвинутых организмов. Механизмы иммунного ответа асцидий имеют много общих черт с защитными механизмами, свойственными большинству беспозвоночных. С другой стороны, эти реакции асцидий очень схожи с реакциями врожденного иммунитета позвоночных. До настоящего времени не проводилось работ по изучению циркулирующих клеток асцидий с помощью проточной цитометрии, в то время как этот метод уже зарекомендовал себя в работах на высших позвоночных животных и активно внедряется в изучение беспозвоночных животных. В ходе собственных исследований данный метод был применен для изучения гемоцитов асцидии *Halocynthia purpurea*. Был разработан трехпараметрический алгоритм анализа, основанный на определении прямого (малоуглового) и бокового светорассеивания, что позволяет выделять популяции клеток, основываясь на размерах и структуре цитоплазмы, а также автофлуоресценции клеток по каналу RMT2.

Показано, что пул циркулирующих гемоцитов содержит как минимум 6 популяций клеток, различных по размерам, гранулярности и способности к автофлуоресценции. По каналу RMT2 четко выделяются автофлуоресцирующие морулярные клетки. Их в свою очередь можно разделить на 2 популяции по размеру и гранулярности. Согласно данным литературы (Parrinello, Cammarata, 1996), это морулярные клетки типа А и типа В. В целом морулярные клетки асцидии можно описать как грануляр-

ные клетки средних и крупных размеров, обладающие автофлуоресценцией. Самые маленькие клетки без гранул, соответствовали гемобластам. Гемоциты, содержащие большое количество гранул определяли как гранулоциты. Среди фагоцитов асцидии *H. purpurea* выделялись 2 популяции, различающиеся в основном по содержанию гранул: гиалиновые амебоциты и макрофагоподобные клетки соответственно. Исследование клеточных популяций с помощью метода проточной цитометрии подтверждают данные световой микроскопии.

Важным аспектом работы являлось изучение ответа циркулирующих клеток асцидии в ответ на повреждение покровов *in vivo*. Исследовали динамику различных типов клеток в зависимости от срока после повреждения. Наибольшим изменениям подвержены морулярные клетки и фагоциты. У интактных животных среднее содержание морулярных клеток В-типа в циркуляции равно  $43.73 \pm 4.04\%$ . Через 1 сут после повреждения туники их число снижается до  $34.2 \pm 5.16\%$ , а через 48 ч этот показатель становится равным  $30.84 \pm 2.65\%$ . Популяция гиалиновых амебоцитов, напротив, увеличивается. У интактных асцидий она равна  $20.86 \pm 3.06\%$ , через 24 ч  $24.89 \pm 5.77\%$ , через 48 ч  $38.86 \pm 0.61\%$ . Макрофаги показывают сначала увеличение популяции с  $23.52 \pm 4.97\%$  до  $30.63 \pm 2.63\%$ , а через 48 ч понижение численности клеток до  $19.43 \pm 3.26\%$ . В остальных популяциях клеток динамики не обнаруживалось. Было показано незначительное понижение численности морулярных клеток типа А с  $3.72 \pm 0.77\%$  до  $2.23 \pm 0.14\%$  через 24 ч, и до  $1.3 \pm 0.14\%$ . Полученные данные свидетельствуют о том, что морулярные клетки играют важную роль в заживлении раны, что также подтверждается литературными данными. Не менее важную роль играют фагоциты, ответственные за элиминацию патогена, попавшего в кровоток при повреждении.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 08-04-00084 и 08-04-00111).

**НАПРАВЛЕННАЯ МИГРАЦИЯ МОНОНУКЛЕАРОВ КОСТНОГО МОЗГА ПРИ ИНТРАКОРОНАРНОМ ТРАНСВЕНТРИКУЛЯРНОМ ВВЕДЕНИИ. © Т. Х. Фатхудинов,<sup>1,3</sup> Г. А. Слащева,<sup>2</sup> Г. Б. Большакова,<sup>3</sup> О. Н. Хохлова,<sup>2</sup> И. А. Арутюнян,<sup>1</sup> И. А. Илюшкина,<sup>2</sup> А. Н. Мурашев,<sup>2</sup> Д. В. Гольдштейн.<sup>1</sup>** <sup>1</sup>ЗАО «Реметэкс», Москва, <sup>2</sup>Филиал Института биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Пушкино, и <sup>3</sup>ГУ НИИ морфологии человека РАМН, Москва.

На сегодняшний день отсутствуют четкие представления о механизмах стимуляции репаративных процессов миокарда при трансплантации стволовых/прогениторных клеток. Остается неясной роль трансплантированных клеток в репарации миокарда: могут ли они мигрировать в область повреждения и дифференцироваться в кардиомиоциты и клетки кровеносных сосудов?

Цель исследования — изучить направления миграции, выживаемость и дифференцировку моноклеаров костного мозга при интракоронарном трансвентрикулярном способе введения.

Меченные PkH26 (Sigma) аутогенные моноклеары костного мозга, 5 млн клеток в 1 мл физиологического раствора, выделенные по стандартной методике по гради-

енту плотности, вводили интракоронарно крысам ( $n = 4$ ) через 30 сут после перенесенного острого инфаркта миокарда с реперфузией. Для этого был впервые разработан интракоронарный трансвентрикулярный способ доставки клеток, который позволяет вводить клетки в коронарные сосуды мелким лабораторным животным без рентгенологического контроля локализации катетера. Клетки вводили в полость левого желудочка при одновременном пережатии аорты на несколько секунд, что приводило к попаданию большого количества клеток в правую и левую коронарные артерии. Через 2 и 4 нед после трансплантации животных выводили из эксперимента и изучали наличие и локализацию меченых клеток в сердце, селезенке, печени и легких с помощью флуоресцентного микроскопа.

Через 2 нед после трансплантации скопления меченых моноклеаров наблюдали в сердце и селезенке, в то время как в печени и легких присутствовали лишь единичные клетки. В сердце маркированные клетки обнаруживали только в рубцовой ткани в среднем количестве  $55.5 \pm 17.7$  клетки в поле зрения при увеличении в 400 раз. В селезенке также наблюдали большое количество клеток в поле зрения —  $52.3 \pm 9.5$  клетки, тогда как в печени и легких выявляли единичные клетки — соответственно  $2.9 \pm 1.9$  и  $1.4 \pm 1.7$  клетки. Через 4 нед после введения в сердце меченые клетки были локализованы по-прежнему только в зоне рубца, их количество в среднем составило  $34.5 \pm 13.4$ . В селезенке также выявили большое количество меченых моноклеаров —  $43.8 \pm 13.1$  клетки. В печени и легких наблюдали  $7.6 \pm 3.1$  и  $3.1 \pm 4.0$  клетки соответственно. На всех сроках в тканях сердца трансплантированные меченые клетки были выявлены только в рубцовой ткани, при этом они не входили в состав кровеносных сосудов соединительной ткани, были окружены толстыми пучками коллагеновых волокон и, по-видимому, дифференцировались в фибробласты. Меченых клеток не было выявлено ни в области инфаркта, ни в зоне неповрежденных кардиомиоцитов. В селезенке трансплантированные клетки наблюдали только в зоне красной пульпы.

Данные результаты демонстрируют, что разработанный метод трансвентрикулярной интракоронарной трансплантации клеток является эффективным и обеспечивает доставку клеток в область повреждения. Локализация моноклеаров в зоне рубца указывает на их миграцию в зону повреждения при их равномерном распределении во время введения в правую и левую коронарные артерии. Массивный хоуминг в селезенку связан с тем, что селезенка является органом кроветворения, т. е. естественной нишей введенного нами клеточного трансплантата. Трансплантированные клетки в сердце локализуются только в рубцовой ткани, не дифференцируются в кардиомиоциты и клетки кровеносных сосудов.

**МЕЖТКАНЕВЫЕ ВАРИАЦИИ В ЭФФЕКТИВНОСТИ ЭЛИМИНАЦИИ ГИСТОНА  $\gamma$ -H2AX В ТКАНЯХ ПОСЛЕ РЕНТГЕНОВСКОГО ОБЛУЧЕНИЯ.** © Д. В. Фирсанов, В. М. Михайлов, Н. В. Томили. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Двойные разрывы (ДР) ДНК являются наиболее опасными повреждениями генома и могут приводить к хромосомным перестройкам, гибели клеток и неопластической трансформации. Возникновение ДР индуцирует быстрое фосфорилирование по 139-серину гистона H2AX в мега-

базных доменах хроматина. Это приводит к образованию в ядрах дискретных фокусов, содержащих фосфорилированную форму H2AX ( $\gamma$ -H2AX). В клетках человека максимальное фосфорилирование H2AX наблюдается через 1 ч после рентгеновского облучения. Затем, как показано с помощью методики иммуноблотинга и подсчета фокусов  $\gamma$ -H2AX, происходит его медленная элиминация из хроматина. Динамика изменения относительного количества  $\gamma$ -H2AX, по-видимому, отражает динамику репарации ДР ДНК. Несмотря на обилие данных по элиминации  $\gamma$ -H2AX в культурах клеток после облучения, межтканевые вариации этого параметра плохо изучены. Данные, полученные на мышах, указывают на значительные вариации в эффективности элиминации гистона  $\gamma$ -H2AX в терминально дифференцированных клетках сердца и почки. Через 23 ч после рентгеновского облучения ~50 % ядер клеток сердца мышей C57BL являются  $\gamma$ -H2AX-положительными. Эти иммуногистохимические данные указывают на сильную задержку в восстановлении хроматина в клетках сердца мышей после рентгеновского облучения. Элиминация  $\gamma$ -H2AX может происходить путем обмена гистонов, и данные, полученные на дрожжах, это подтверждают. Уровень исчезновения  $\gamma$ -H2AX может быть связан с влиянием белков, участвующих в перестройках хроматина. У человека экспрессия гена hTirp60 в необлученных тканях сердца снижена по сравнению с почкой. Предполагается, что это может объяснить низкий уровень исчезновения  $\gamma$ -H2AX в сердце у мышей после рентгеновского облучения. В нашей работе с помощью методики иммуноблотинга мы исследовали динамику элиминации гистона  $\gamma$ -H2AX в тканях сердца и печени сирийского хомячка *in situ*. По нашим данным, вариации в эффективности элиминации гистона  $\gamma$ -H2AX между тканями сердца и печени отсутствуют. Гистон  $\gamma$ -H2AX полностью элиминируется через 24 ч после рентгеновского облучения в дозе 5 Гр до значения у необлученных животных. Проанализировав с помощью ПЦР в реальном времени экспрессию генов хроматинремодулирующих комплексов Tirp60 и SSRP1, мы получили, что в сердце и печени хомячка эти гены экспрессируются на одном уровне. Такие противоречивые результаты можно объяснить как разницей в чувствительности методов, используемых в двух работах, так и межвидовыми вариациями в эффективности элиминации гистона  $\gamma$ -H2AX в сердце у сирийских хомячков и лабораторных мышей. В дальнейшем мы собираемся углубить исследования в этом направлении.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 07-04-00315).

**СПОНТАННАЯ И ИНДУЦИРОВАННАЯ МИОГЕННАЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКА ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ КЛЕТОК ПЕЧЕНИ ЗАРОДЫШЕЙ КРЫСЫ.** © О. Н. Хныкова, О. В. Паюшина, М. Н. Кожевникова, Н. Н. Буторина, В. И. Старостин. Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН, Москва, olga-khnykova@mail.ru.

Зародышевая печень является источником мезенхимных стромальных клеток (МСК). В специализированных индукционных средах МСК способны дифференцироваться в различных направлениях: остеогенном, адипогенном, хондрогенном, а также, по некоторым данным, в нейральном и миогенном. В данной работе показано, что



в первичной культуре зародышевой печени крысы спонтанно формируются миосимпласты скелетной мышечной ткани. Клетки печени 16—17-суточных плодов крыс породы Wistar культивировали в среде DMEM с 10 % сыворотки плодов коровы; присутствие маркеров миогенеза анализировали методами иммуноцитохимии. На 3-и сут культивирования в ядрах отдельных клеток был выявлен транскрипционный фактор скелетных мышц MyoD, на 5-е отмечено формирование многоядерных миотуб. На 10-е сут культивирования мы наблюдали спонтанные сокращения миосимпластов. В этот же срок было показано присутствие в клетках десмина и миозина; сохранялась также и экспрессия MyoD. Число миотуб и частота их образования увеличивались при культивировании клеток печени на фибронектиновом покрытии: на пластике образовывалось  $0.61 \pm 0.34$  миотубы на  $1 \text{ см}^2$ , на фибронектине в тех же условиях —  $7.30 \pm 1.55$ . При этом добавление фибронектина в среду не вызывало достоверного повышения числа миотуб: оно составляло  $0.77 \pm 0.53$  на  $1 \text{ см}^2$ . Результаты свидетельствуют об усиленной адгезии миогенных предшественников к фибронектину по сравнению с пластиком. Спонтанный миогенез наблюдался только в первичной культуре клеток из печени плодов. На 1-м пассаже клетки зародышевой печени, культивируемые в аналогичных условиях, в том числе на фибронектине, не экспрессировали MyoD и не формировали миотуб. В культурах клеток костного мозга, являющегося, как и зародышевая печень, источником МСК, миогенных предшественников обнаружено не было. Попытка индукции миогенеза в культуре МСК зародышевой печени на 4-м пассаже 5-азациитидином не дала положительных результатов. При индукции дифференцировки на 5-м пассаже в среде DMEM, содержащей 2 % FCS, EGF, PDGF, ITS+1, 2-фосфо-L-аскорбат натрия и 5-азациитидин, миотубы также не формировались. На 14-е сут индукции в культуре отсутствовала экспрессия MyoD, однако в некоторых ядрах был выявлен фактор транскрипции GATA-4, специфичный для дифференцировки кардиомиоцитов. Как показало иммуноцитохимическое окрашивание криостатных срезов печени плодов крысы, ядра отдельных клеток содержали MyoD, что говорит о присутствии в печени миогенных предшественников. Мы полагаем, что именно эти клетки, а не МСК ответственны за спонтанное образование миотуб в первичной культуре зародышевой печени. Выяснение этого вопроса требует дальнейших исследований.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 09-04-00002) и гранта президента РФ «Ведущие научные школы» (НШ-1134.2008.4).

**ВЛИЯНИЕ КОМПОНЕНТОВ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА НА КЛОНАЛЬНЫЙ РОСТ И ОСТЕОГЕННУЮ ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК КРЫСЫ** © О. Н. Хныкова, О. В. Паюшина, Н. Н. Буторина, Э. И. Бувверова, В. И. Старостин. Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН, Москва, payushina@mail.ru.

Белки внеклеточного матрикса являются важными компонентами микроокружения мезенхимных стромальных клеток (МСК). Изучение адгезивных взаимодействий МСК с матриксом имеет важное значение для выяснения механизмов регуляции их пролиферации и дифференци-

ровки и представляет интерес для разработки методов клеточной терапии. В настоящей работе проанализировано влияние ряда белков матрикса — коллагена I типа, ламинина и фибронектина — на клональный рост и остеогенные потенции МСК крысы. МСК идентифицировали как колониеобразующие единицы фибробластов (КОЕ-Ф). Для оценки числа КОЕ-Ф, прикрепляющихся к субстрату в различные сроки культивирования, суспензию клеток костного мозга половозрелых крыс или печени 16-суточных плодов крысы помещали в пластиковые культуральные флаконы, покрытые изучаемыми белками. Контролем служили флаконы без белкового покрытия. Спустя 7 сут проводили смену среды, после чего прикрепившиеся за это время клетки культивировали до образования стромальных колоний, а удаляемую среду с неприкрепившимися клетками переносили в новые флаконы с тем же покрытием и также культивировали до образования колоний. Как показал подсчет числа колоний, после 7 сут культивирования на пластике часть КОЕ-Ф зародышевой печени и еще более высокая доля КОЕ-Ф костного мозга оставались неприкрепленными. Покрытие флаконов фибронектином, коллагеном I типа и в меньшей степени ламинином значительно повышало долю КОЕ-Ф, прикрепившихся в первые 7 сут, в популяциях клеток из обоих органов. В целом, судя по соотношению числа колоний, образованных прикрепившимися и не прикрепившимися за этот срок клетками, КОЕ-Ф зародышевой печени были более адгезивны ко всем изучаемым белкам, чем КОЕ-Ф костного мозга. Оценка активности щелочной фосфатазы, маркирующей ранние стадии остеогенеза, показала, что среди КОЕ-Ф костного мозга, культивируемых на коллагене I типа или ламинине, доля остеогенных клеток сопоставима с таковой на пластике, тогда как на фибронектине она существенно снижена. Доля остеогенных клеток среди КОЕ-Ф из зародышевой печени была крайне низкой независимо от присутствия белков матрикса. Ингибирующее влияние фибронектина на остеогенную дифференцировку МСК костного мозга было показано и при их культивировании в индукционной среде: на фибронектине в очагах остеогенеза откладывалось значительно меньше солей кальция, чем на пластике, тогда как коллаген и ламинин не оказывали достоверного эффекта. В дальнейших исследованиях будет продолжена оценка влияния белков внеклеточного матрикса на дифференцировку МСК и проанализированы молекулярные механизмы этого влияния.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 09-04-00002) и гранта президента РФ «Ведущие научные школы» (НШ-1134.2008.4).

**РОЛЬ ТУННЕЛЬНЫХ НАНОТРУБОЧЕК В ТРАНСПОРТЕ КЛЕТОЧНЫХ СТРУКТУР МЕЖДУ МУЛЬТИПОТЕНТНЫМИ МЕЗЕНХИМНЫМИ СТРОМАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ ЭПИТЕЛИЯ ПОЧЕЧНЫХ КАНАЛЬЦЕВ.** © Т. Г. Хряпенкова, Е. Ю. Плотников, Д. Б. Зоров. НИИ физико-химической биологии Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова.

Различные способы межклеточных коммуникаций активно изучаются на сегодняшний день во всем мире. Особый интерес представляют взаимодействия в смешанных культурах, содержащих клетки разных типов. Во многом

повышенный интерес к этой теме связан с развитием регенеративной клеточной терапии и изучением ее механизмов на клеточном уровне. Для клинического продвижения клеточных технологий необходимо выяснить, какие контакты возникают между различными клетками и какова их роль в терапевтическом контексте. Новейшим направлением в этой области является исследование контактов, основанных на образовании тонких мембранных структур, названных туннельными нанотрубочками (ТНТ). ТНТ способны осуществлять передачу различных внутриклеточных компонентов между клетками, расположенными на достаточном удалении друг от друга, что отличает их от других клеточных контактов. В данной работе была исследована возможность межклеточного транспорта посредством ТНТ на примере ММСК и клеток эпителия почечных канальцев крыс. Для визуализации митохондрий, цитоплазматического содержимого и липидных мембран использовали флуоресцентные зонды Mitotracker Green, Calcein-AM и DiO соответственно. Микроскопическое изучение клеток смешанной культуры проводили на конфокальном лазерном сканирующем микроскопе LSM510; сравнительный анализ транспорта различных зондов в клетках на разных этапах сокультивирования проводили с помощью проточного цитометра CyFlow (Partec GmbH, Германия). Совместную культуру поддерживали в течение 3—24 ч. Обнаружено, что между ММСК и клетками почки происходит образование межклеточных контактов, посредством которых клетки могут обмениваться внутриклеточным содержимым. В условиях совместного культивирования способность клеток образовывать ТНТ существенно возросла, тогда как в монокультуре ММСК или клеток почечного эпителия контактов такого типа практически не наблюдалось. Цитометрический анализ показал, что уже через 3 ч наблюдается уменьшение интенсивности флуоресценции в популяции, нагруженной Mitotracker, и соответственно увеличивается флуоресценция изначально неокрашенных клеток. Эта тенденция продолжала развиваться к 24 ч; к 48 ч сокультивирования пики флуоресценции обеих популяций практически сливались. Это свидетельствовало о том, что происходит транспорт митохондриального красителя, т. е. ММСК передают окрашенные Mitotracker митохондрии в клетки почки. Аналогично исследовали обмен цитоплазматическим содержимым и мембранными компонентами. Было обнаружено, что сразу после смешивания в культуре выделяются две популяции с разной интенсивностью флуоресценции Calcein или DiO: неокрашенные клетки почки попадают в популяцию с низкой интенсивностью флуоресценции, а клетки, несущие зонд, — в пик с высокой ее интенсивностью. При сокультивировании происходят уменьшение обеих начальных популяций и появление большого числа клеток с промежуточными значениями интенсивности флуоресценции, т. е. клеток почки, в которые перешел зонд из ММСК. В случае с Calcein через 6 ч доля таких клеток составляла 19.4 %, через 24 ч — 32 %, а через 48 ч — более 38 % всей культуры. При окрашивании мембранных липидов DiO через 6 ч доля клеток, получивших зонд от ММСК, составляла 14.7 %, а через 24 и 48 ч — около 45 % всей культуры. Очевидно, что увеличение числа клеток со средней интенсивностью флуоресценции отражает перенос компонентов цитоплазмы или мембран из ММСК в неокрашенные клетки почки. Подводя итог, можно сказать, что мультипотентные стромальные клетки и клетки эпителия почки взаимодействуют между собой в совмест-

ной культуре посредством специфических контактов, способных осуществлять передачу митохондрий и различных цитоплазматических и мембранных компонентов.

**КУЛЬТИВИРУЕМЫЕ КЛЕТКИ ВОЛОСЯНОГО ФОЛЛИКУЛА ЧЕЛОВЕКА СПОСОБНЫ ВСТРАИВАТЬСЯ В СТРУКТУРУ КОЖИ ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ.**  
© Э. С. Чермных, Е. А. Воротеляк, А. В. Васильев, В. В. Терских. Институт биологии развития им. Н. К. Колцова РАН, Москва.

Метод клеточной трансплантации в настоящее время считается наиболее перспективным для стимуляции регенеративно-репаративных процессов в организме. Поэтому изучение поведения клеток, изолированных из их ниши (условий *in vivo*), а затем после культивирования *in vitro* возвращенных обратно, является актуальным направлением клеточных технологий. Для решения такой проблемы, как облысение, может быть применена трансплантация клеток волосяного фолликула. Для восстановления роста волос необходимо использование двух клеточных компонентов волосяного фолликула — эпителиальных и мезенхимных клеток. Популяция мезенхимных клеток волосяного фолликула представляет собой фибробластоподобные клетки, которые формируют морфогенетически отличимую структуру, называемую дермальной папиллой (ДП). Эти клетки играют важную роль в эмбриональном развитии и поддержании функционирования волосяного фолликула и контроля цикла роста волоса в постнатальном организме.

В настоящем исследовании мы инъектировали клеточные популяции волосяного фолликула под эпидермис фрагментов кожи человека с последующей трансплантацией этих фрагментов бестимусным мышам. Фрагменты далее подшивали под кожу спины бестимусным мышам. Такая система позволила изучать поведение клеток в условиях, максимально приближенных к ситуации *in vivo*. Для идентификации инъектированных клеток использовали лентивирусную метку. Через 4 и 8 нед проводили исследование срезов фрагментов кожи с помощью флуоресцентного микроскопа. Результаты эксперимента показали, что инъектированные клетки выживают в течение времени эксперимента и располагаются в соответствующих структурах кожи. Эпидермальные кератиноциты были главным образом найдены в составе волосяных фолликулов и частично в зоне межфолликулярного эпидермиса, а клетки ДП — в папиллярной дерме. Меченые клетки ДП были обнаружены не только в месте инъекции, но и в примыкающей дерме, что свидетельствует о том, что происходила миграция клеток в направлении от места вкола. Некоторые окрашенные клетки обнаруживались в окружении волосяного фолликула, в месте, соответствующем ДП и наружному соединительнотканному чехлику волосяного фолликула. Результаты настоящего исследования показали, что культивированные клетки волосяного фолликула полностью сохраняют способность встраиваться в структуру кожи, находя там свою нишу. Таким образом, выращенные эпидермальные и мезенхимные клетки в культуре могут быть использованы для реконструкции волосяных фолликулов.

**ТРАНСПЛАНТАЦИЯ АУТОЛОГИЧНЫХ КОСТНО-МОЗГОВЫХ КЛЕТОК В ЛЕЧЕНИИ ТРАВМАТИЧЕ-**



СКОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ СПИННОГО МОЗГА. © Е. Р. Черных, М. Ю. Сизиков, В. В. Ступак, Ж. М. Мурадов, Е. Я. Шевела, О. Ю. Леплина, А. А. Останин, А. Д. Кулагин, В. В. Сергеевичева, И. А. Лисуков, В. А. Козлов. НИИ клинической иммунологии СО РАМН и НИИ травматологии и ортопедии Федерального агентства по высокотехнологической медицинской помощи, Новосибирск, ct\_lab@mail.ru.

Травматические повреждения спинного мозга (ТПСМ) остаются серьезной медицинской проблемой в связи с отсутствием эффективных методов лечения. Большие надежды в последнее время связывают с методами регенеративной медицины, в частности, применением клеточных технологий. Целью настоящего исследования явилось сравнительное исследование костномозговых клеток доноров и больных с ТПСМ и изучение безопасности и клинической эффективности трансплантации аутологичных клеток костного мозга (ауто-ТКМ) в лечении больных с полным повреждением спинного мозга в позднем периоде.

Мононуклеарные клетки (МНК) аспирата костного мозга выделяли методом градиентного центрифугирования и оценивали количество и функции основных субпопуляций лимфоцитов, стволовых кроветворных клеток и мезенхимных стромальных клеток. МНК разделяли на фракцию прилипающих и неприлипающих клеток и вводили в 2 режимах: внутривенно и в зону повреждения спинного мозга (I протокол) либо внутривенно и эндолумбально (II протокол). Обследование больных включало в себя оценку неврологического статуса (с использованием стандартов ASIA и шкалы Франкеля), функциональной адаптационной активности (шкала Бартела), выраженности спастического синдрома, а также электрофизиологическое обследование и магнитно-резонансную томографию.

Оценка костномозговых клеток у больных с полным функциональным повреждением спинного мозга ( $n = 20$ ) и доноров ( $n = 12$ ) показала, что костный мозг пациентов не отличается от доноров по структуре основных субпопуляций (CD3, CD4, CD8, CD16 и CD20) и пролиферативной активности лимфоцитов, является полноценным источником гемопоэтических предшественников и мезенхимных стромальных клеток и, следовательно, может быть использован для аутологичных трансплантаций. Для анализа безопасности и эффективности первого режима введения клеток были отобраны 36 пациентов. Больные контрольной группы (18) получали хирургическое лечение (миелорадикулолиз), исследуемой группы — хирургическое лечение и трансплантацию аутологичных костномозговых клеток. Исследование эффективности и безопасности второго режима введения костномозговых клеток был проведено в группе 16 пациентов. Одновременное введение костномозговых клеток внутривенно и непосредственно в спинной мозг (или эндолумбально) характеризовалось хорошей переносимостью и не вызывало каких-либо локальных или системных побочных реакций, эктопической оссификации в области введения клеток и образования опухолей в зоне повреждения спинного мозга. Неврологическое улучшение в исследуемой группе (I протокол) регистрировалось достоверно чаще, чем в контрольной группе (66.7 против 27.8 %;  $P_{\text{ТМФ}} = 0.04$ ), и проявлялось улучшением двигательной ( $n = 9$ ) и чувствительной сегментарной активности ( $n = 12$ ), проводниковой чувствительности ( $n = 4$ ) и функции тазовых

органов ( $n = 4$ ). Улучшение неврологических исходов в исследуемой группе сопровождалось достоверным снижением спастичности и усилением функциональных адаптационных возможностей. При сочетанном внутривенном и эндолумбальном введении костномозговых клеток положительная неврологическая динамика наблюдалась у половины больных и проявлялась улучшением моторной функции у 8 из 16 пациентов и сегментарной чувствительности — у 10 из 16 больных. У 4 ответивших на терапию пациентов было отмечено улучшение проводниковой чувствительной активности и функции тазовых органов.

Таким образом, одновременное введение аутологичных костномозговых клеток внутривенно и непосредственно в пораженный спинной мозг (или эндолумбально) характеризуется удовлетворительно переносимостью, отсутствием побочных реакций и улучшением неврологического статуса. Однако для более точной оценки эффективности костномозговых клеток в лечении больных с ТПСМ необходимы рандомизированные исследования в более представительных выборках пациентов и с более длительным проспективным наблюдением.

НЕЙРОНАЛЬНАЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКА КЛЕТОК НЕЙРОБЛАСТОМЫ *NEURO2A* ПОД ДЕЙСТВИЕМ ИНГИБИТОРОВ ГИСТОНОВЫХ ДЕАЦЕТИЛАЗ ТРИХОСТАТИНА А И ВАЛЬПРОЕВОЙ КИСЛОТЫ. © И. А. Чистякова, Г. П. Пинаев. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Клетки нейробластом происходят из нейроэпителиальных клеток нервного гребня, являющихся слабодифференцированными предшественниками нейронов и глии. Под воздействием специфических индукторов дифференцировки клетки нейробластом способны давать длинные отростки и формировать сети *in vitro*. Поэтому линии этих клеток используют для изучения процессов клеточной дифференцировки. Ингибиторы гистоновых деацетилаз (HDAC), такие как трихостатин А (TSA), вальпроевая кислота (VPA) и бутират натрия, способны вызывать нейрональную дифференцировку прогениторных клеток мозга и клеток некоторых линий нейробластом и эмбриональных карцином. Основной клеточный эффект ингибиторов HDAC в первую очередь связан с гиперацетилированием гистонов, декомпактизацией хроматина и облегчением доступа транскрипционных факторов к промоторным участкам генов. Таким образом, ингибиторы HDAC переориентируют транскрипционную программу клетки, что ведет к быстрому изменению ее функционального состояния. Известно, что при дифференцировке под действием ингибиторов HDAC происходит усиление транскрипции целого ряда генов. Однако в ходе дифференцировочного процесса одни гены должны экспрессироваться постоянно или временно, в определенной последовательности, а другие должны прекратить свою активность.

В данной работе представлены оригинальные методы дифференцировки клеток нейробластомы *Neuro2a* с помощью ингибиторов HDAC, TSA и VPA. Главной отличительной особенностью этих методов является однократное введение TSA и VPA в отличие от общепринятого многократного введения индукторов дифференцировки. Однократного введения в культуру TSA и VPA оказалось достаточно для развития в течение 6 сут морфологически выраженной дифференцировки с формированием сети из

отдельных клеток и клеточных агрегатов. Так как TSA сохраняет свою активность в течение длительного времени, клетки нейробластомы отмывали от TSA через 2 сут индукции (время, являющееся минимальным для развития в дальнейшем выраженной морфологической дифференцировки). VPA является неустойчивым веществом, поэтому клетки не отмывали специально от этого индуктора. Под действием обоих индукторов обнаруживается сходство идущей морфологической дифференцировки при различии временных параметров дифференцировочных периодов. Главным отличием трихостатиновой дифференцировочной модели является наличие длительного (4 сут) латентного периода дифференцировки (время от момента введения индуктора до начала роста отростков). Для VPA это время составляет 2 сут. Разнесенность времени введения индукторов и начала роста отростков дает возможность определять экспрессию сигнальных и структурных белков на различных стадиях морфологической дифференцировки. Кроме того, было обнаружено, что повторное введение TSA или VPA в определенной временной точке перед началом роста отростков, т. е. в момент предполагаемой смены транскрипционных программ, препятствует росту отростков. Поэтому были также созданы модельные клеточные системы торможения нейрональной дифференцировки с помощью повторного введения индукторов. Повышение или снижение экспрессии различных белков в моделях торможения дифференцировки позволит определять белки, необходимые (обязательные) для роста отростков и препятствующие их росту. Рост отростков при нейрональной дифференцировке связан в первую очередь с синтезом цитоскелетных белков. Методом белкового электрофореза с последующим Вестерн-блот-анализом было определено содержание на разных сроках дифференцировки нескольких актинсвязывающих белков, находящихся в цитоплазме в свободном, не связанном с цитоскелетом состоянии. Было обнаружено многократное усиление экспрессии в клетках двух белков — актинина-1 и актинина-4 — по временным параметрам совпадающее с латентным периодом дифференцировки. На момент начала роста отростков уровень этих белков в цитоплазме клеток падал до базального. В то же время в модели торможения дифференцировки с использованием VPA наблюдали постоянный повышенный уровень актинина-4 в цитоплазме клеток и отсутствие роста отростков в культуре. Таким образом, повышенный уровень не связанного с цитоскелетом актинина-4, по-видимому, препятствует росту отростков. В связи со значительным повышением содержания обоих белков в латентный период дифференцировки можно предположить их причастность к проведению дифференцировочного сигнала. Таким образом, разработанные модели удобны для изучения молекулярных механизмов запуска, течения и регуляции нейрональной дифференцировки.

**ИНКАПСУЛЯЦИЯ КЛЕТОК ГЛИОМЫ U251 МЕЗЕНХИМНЫМИ СТВОЛОВЫМИ КЛЕТКАМИ КОСТНОГО МОЗГА ЧЕЛОВЕКА IN VITRO.** © И. А. Чистякова,<sup>1</sup> Н. В. Абрамова,<sup>1</sup> А. Ф. Гурчин,<sup>2</sup> Г. П. Пинаев.<sup>1</sup> <sup>1</sup> Институт цитологии РАН и <sup>2</sup> Институт мозга человека РАН, Санкт-Петербург.

В настоящее время не существует эффективного лечения злокачественных глиом, наиболее распространенной злокачественной опухоли мозга взрослого человека,

и время жизни пациентов при сложном комбинированном лечении составляет в лучшем случае 1 год. Плохой прогноз связан в первую очередь с высокой частотой рецидивов, обусловленной повышенной выживаемостью клеток глиом. В связи с этим ведется поиск новых подходов к лечению этих солидных опухолей. Согласно существующей концепции, костный мозг является источником циркулирующих стволовых клеток, которые поступают в органы и ткани в ответ на тканевую стресс или повреждение. Микроокружение солидных опухолей сходно с микроокружением поврежденных или стрессированных тканей. В недавних исследованиях было показано, что мезенхимные стволовые клетки (МСК) костного мозга имеют тропизм по отношению к солидным опухолям, в том числе к глиомам, и способны мигрировать внутрь опухоли. Поэтому МСК рассматривают как возможный носитель векторов при опухолевой терапии. В данной работе было исследовано взаимное влияние клеток глиомы человека линии U251 и фибробластоподобных МСК костного мозга человека в смешанной культуре. Было обнаружено, что через несколько суток совместного культивирования этих клеток в несколько раз усиливается пролиферация МСК. При культивировании МСК в кондиционированной среде или на субстрате, синтезируемом клетками глиомы, эффекта усиления пролиферации выявлено не было. Возможно, стимулирующее влияние на пролиферацию оказывает только сочетанное действие растворимых факторов и белков внеклеточного матрикса, секретируемых глиомами клетками. При пространственном разнесении клеток глиомы и МСК, когда клетки культивировали в разных половинах чашки Петри, миграции МСК к монослойному пласту глиомных клеток обнаружено не было. Однако при посеве смешанной суспензии двух типов клеток в условиях средней плотности (субконфлюэнтная культура) наблюдалась картина инкапсуляции островков глиомных клеток контактирующими с ними клетками МСК. По границе глиомных островков наблюдалось плотное прилегание клеток МСК друг к другу, что препятствовало разрастанию островков на плоскости чашки Петри. В этих условиях часть клеток глиомы, продолжающих делиться, вытеснялась наверх. В результате формировались многослойные глиомные островки. При этом клетки верхних слоев постепенно гибли. Таким образом, глиомные островки оказывались изолированными на плоскости чашки Петри, а пролиферирующие клетки МСК заполняли пространство между островками. Для сравнения было проведено сокультивирование клеток глиомы U251 с фибробластами кожи человека. Высокий пролиферативный уровень фибробластов кожи приводил к быстрому заполнению свободного пространства чашки Петри этими клетками. При этом, однако, не было обнаружено эффекта инкапсуляции фибробластами глиомных островков. Фибробласты кожи не ограничивали увеличение в размере островков. Островки оставались неправильной формы, и клетки глиомы могли как заполнять пространства между фибробластами, так и размещаться на них сверху. Таким образом, МСК костного мозга ограничивают рост и жизнеспособность глиомных клеток и могут быть использованы при разработке способов терапии злокачественных глиом.

**ХАРАКТЕРИСТИКА СУБПОПУЛЯЦИИ КЛЕТОК, СЛАБО СВЯЗАННЫХ С ЦЕЛОМИЧЕСКИМ ЭПИТЕЛИЕМ МОРСКОЙ ЗВЕЗДЫ *ASTERIAS RUBENS* L., ПРИ**



КУЛЬТИВИРОВАНИИ НА ЛАМИНИНЕ. © Н. С. Шарлаимова, О. А. Петухова. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Восполнение клеточной популяции целомоцитов (ЦЦ) *Asteroidea* при травмировании происходит достаточно быстро, однако источник и особенности дифференцировки этих клеток до сих пор мало изучены. Одним из предполагаемых источников ЦЦ при значительной потере целомической жидкости (ЦЖ) являются малодифференцированные клетки целомического эпителия (ЦЭ). Проведенный ранее морфологический анализ динамики состава этого типа клеток в популяции клеток ЦЭ морской звезды *Asterias rubens* L., а также анализ их пролиферативной активности не выявили значительных изменений в суспензии клеток ЦЭ на разных сроках после травмирования. Однако удалось получить обогащение популяции этим типом клеток после посадки суспензии клеток ЦЭ на ламинин (Лм). В процессе ферментативного выделения клеток была обнаружена субпопуляция клеток, слабо связанных с ЦЭ (ЦЭс), которые могут быть выделены без дополнительной ферментативной обработки. Данная субпопуляция клеток не была исследована ранее, а ее способность диссоциировать от ЦЭ в определенных условиях указывает на ее особые функции, которые могут быть связаны с восполнением клеточной популяции ЦЦ. Целью настоящей работы являлся сравнительный анализ новой субпопуляции клеток ЦЭ с популяцией клеток ЦЭ, выделенных от контрольных и травмированных животных, — морфологический анализ суммарного клеточного состава, состава популяции после прикрепления к Лм, а также исследование пролиферативной активности суммарной популяции клеток в условиях *in vitro* при культивировании на Лм. Морфологический анализ суммарной клеточной субпопуляции ЦЭс после окраски азуэрэозином показал, что доля малодифференцированных клеток составляет около 50 %, в то время как в популяции ЦЭ доля данного типа клеток составляет лишь 5—6 %. При анализе клеточной популяции ЦЭ контрольных животных после прикрепления к Лм после окраски родамин-фаллоидином (для выявления элементов цитоскелета) и DAPI (для определения структуры ядерного аппарата) удалось выделить следующие типы клеток — малодифференцированные клетки с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением (40 %), клетки с полярным F-актином (20 %), ЦЦ-подобные (5 %) и петалоидные клетки (30 %). Популяция клеток ЦЭ, выделенных через 5 ч после травмирования, содержала те же типы клеток, однако доля недифференцированных клеток, прикрепленных к Лм, составляла 70 %. Популяция клеток ЦЭс, выделенных как от контрольных, так и травмированных животных через 1 ч после посадки на Лм, содержала 80—90 % малодифференцированных клеток, а также незначительное количество петалоидных и распластанных ЦЦ-подобных клеток со стресс-фибриллами. Через 8 сут культивирования в популяции клеток ЦЭс увеличивалась доля клеток с полярным F-актином, а малодифференцированные клетки обнаруживались в колониеподобных агрегатах и на поверхности распластанных ЦЦ-подобных клеток. Анализ включения BrdU показал, что клетки, прикрепленные к Лм, обладают высокой пролиферативной активностью. На ранних этапах содержания *in vitro* (до 5 сут) включения были обнаружены в малодифференцированных клетках, в то время как через 8 сут включения были обнаружены в колониеподобных агрегатах и в распластанных клетках с цитоплазмой. Ана-

лиз пролиферативной активности клеток, перешедших в суспензионное состояние при культивировании, показал, что способностью включать BrdU обладают также клетки с цитоплазмой. Пролиферативная активность субпопуляции клеток ЦЭс сохраняется до 2 мес культивирования. В настоящей работе было показано, что новая субпопуляция клеток ЦЭ, которая может быть получена без дополнительной ферментативной обработки, характеризуется содержанием высокой доли малодифференцированных клеток, обладающих пролиферативной активностью, причем при посадке на Лм доля данного типа клеток существенно увеличивается. Таким образом, была проведена селекция малодифференцированных клеток ЦЭс, обладающих высокой пролиферативной активностью.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 08-04-10090-к (экспедиция)).

РАЗРАБОТКА УСЛОВИЙ ФОРМИРОВАНИЯ ТРЕХМЕРНЫХ ПОРИСТЫХ МАТРИЦ, ПРЕДНАЗНАЧЕННЫХ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК КОЖИ ЧЕЛОВЕКА. © Ю. А. Швед,<sup>1,2</sup> М. И. Блинова,<sup>1</sup> А. Ю. Билибин,<sup>2</sup> Г. П. Пинаев.<sup>1</sup> <sup>1</sup>Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, и <sup>2</sup>Химический факультет С.-Петербургского государственного университета.

Лечение поврежденных органов и тканей путем введения в организм человека стволовых или дифференцированных клеток является перспективным направлением современной регенеративной медицины. Одними из основополагающих этапов такого метода лечения являются культивирование и трансплантация клеток на рану. Большинство клеток в организме находится в трехмерном окружении, состоящем из белков внеклеточного матрикса, гликопротеинов, протеогликанов и других компонентов ткани. Однако, как правило, *in vitro* рост и размножение клеточных культур осуществляют в виде монослоя на поверхности культурального сосуда, что изменяет клеточные функции. Культивирование клеток в трехмерном пространстве может максимально приблизить условия функционирования клеток к условиям в организме, что в перспективе может быть использовано при создании тканеподобных структур в культуре и дальнейшей их трансплантации для восстановления поврежденных органов и тканей. Целью данного исследования было создание трехмерной пористой матрицы, предназначенной для роста и размножения клеток. К такой матрице предъявляется ряд требований, а именно нетоксичность, резорбируемость, био- и цитосовместимость, а также достаточная механическая прочность. Перспективным материалом для получения таких матриц является полимер на основе молочной кислоты — поли(D,L-лактид). В качестве клеток были выбраны клетки кожи человека — фибробласты. Из широкого спектра предложенных в настоящее время способов формирования пористых матриц был использован метод смешивания полимера с неорганической солью (NaCl) с последующим растворением последней в водной среде. Были разработаны условия формирования пористых полилактидных матриц. Варьирование количественного соотношения полимера и соли позволяет изменять общую пористость матрицы, размер и распределение пор. Исследовано влияние этих параметров на пролиферативную активность фибробластов. Методом сканирующей

электронной микроскопии оценивали распределение клеток внутри матрицы.

**ЦИКЛИЧЕСКИЙ АДЕНОЗИНМОНОФOSFAT КАК ВНЕКЛЕТОЧНЫЙ АКТИВАТОР АДЕНИЛАТЦИКЛАЗЫ У ИНFUЗОРИИ *DILEPTUS ANSER*. © А. О. Шпаков,<sup>1</sup> К. В. Деркач,<sup>1</sup> З. И. Успенская,<sup>2</sup> Л. А. Юдин.<sup>2</sup>** <sup>1</sup> Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН, alex\_shpakov@list.ru, и <sup>2</sup> Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

Циклический аденозинмонофосфат (цАМФ) синтезируется ферментом аденилатциклазой (АЦ) и выполняет функции вторичного посредника, осуществляя передачу сигнала от активированной гормоном аденилатциклазной системы (АЦС) к цАМФ-зависимым эффекторным белкам. Еще сравнительно недавно считали, что цАМФ у эукариот функционирует исключительно как вторичный посредник. Имелись лишь единичные сообщения о том, что он может выполнять функции гормона (первичного посредника) у грибов *Dictyostelium discoideum* и *Neurospora crassa*. Цель исследования состояла в изучении влияния внеклеточного цАМФ на активность АЦС инфузории *Dileptus anser* и выяснении молекулярных механизмов его регуляторного действия. Показано, что меченый цАМФ специфически связывается с клетками *D. anser* со значениями  $K_D$  (27 нМ) и  $V_{max}$  (2.65 фмоль цАМФ на 50 000 клеток). Немеченый цАМФ конкурентно вытеснял [ $^3H$ ]цАМФ ( $IC_{50}$ , 48 нМ;  $K_i$ , 17 нМ), в то время как дибутирил-цАМФ, аденозин и цГМФ в этом отношении были неэффективными. В присутствии ГТФ наблюдалось снижение аффинности цАМФ к рецепторам, что свидетельствует в пользу сопряжения цАМФ-рецепторов инфузории с гетеротримерными G-белками. цАМФ ( $10^{-7}$ — $10^{-4}$  М) отчетливо стимулировал АЦ ( $EC_{50}$ , 2 мкМ), и его эффект усиливался в присутствии гуаниновых нуклеотидов (GppNHp). цАМФ также стимулировал ГТФ-связывание G-белков ( $EC_{50}$ , 8 мкМ). В присутствии сурамина, специфического ингибитора гетеротримерных G-белков, вызываемая цАМФ стимуляция АЦ полностью подавлялась. Блокировались также стимулирующие АЦ эффекты GppNHp и совместно GppNHp и цАМФ. Полученные данные указывают на то, что цАМФ реализует свое влияние на АЦ через гетеротримерные G-белки стимулирующего типа, родственные  $G_s$ -белкам позвоночных животных. Пуриновые нуклеотиды (АМФ, ГМФ и цГМФ) и аденозин практически не влияли на базальную и стимулированную цАМФ активность АЦ. Только дибутирил-цАМФ ( $10^{-4}$  М) повышал базальную активность АЦ и снижал стимулирующий эффект цАМФ. Полученные результаты указывают на высокую специфичность регуляторного действия цАМФ на АЦС инфузории, а также на отсутствие заметного влияния других пуриновых нуклеотидов на цАМФ-зависимые сигнальные пути.

Таким образом, нами впервые показано, что АЦС свободноживущих инфузорий *D. anser* стимулируется вне-

клеточным цАМФ, который специфично связывается с поверхностными рецепторами и реализует свое регуляторное влияние на фермент АЦ через посредство гетеротримерных G-белков. Эти результаты свидетельствуют о том, что цАМФ у инфузорий является не только вторичным посредником, регулирующим цАМФ-зависимые сигнальные каскады, но и выполняет функцию внешнего сигнала, запускающего эти каскады извне.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 09-04-00672а).

**ВЛИЯНИЕ МИКРООКРУЖЕНИЯ НА МОРФОЛОГИЧЕСКУЮ И СИНТЕТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ В КУЛЬТУРЕ ДЕРМАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ РАЗНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ. © Н. М. Юдинцева, М. И. Блинова, Г. П. Пинаев.** Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.

В настоящее время для восстановления кожной поверхности широко применяются дермальные эквиваленты на основе коллагена с заключенными в них фибробластами. Однако при таких условиях на синтез клетками белков ВКМ активно влияет микроокружение, в данном случае сам коллаген. В качестве более адекватного компонента может быть использован фибриновый гель, поскольку клетки в фибриновом геле моделируют те процессы, которые происходят в условиях заживления раны. Большое значение в формировании ткани имеет микроокружение клеток, которое активно влияет на процесс синтеза фибробластами внеклеточного матрикса. По последним литературным данным, фибробласты могут различаться между собой по количественному и качественному составу синтезируемых белков, что должно приводить к созданию специфического микроокружения клеток соответствующей ткани или органа. В связи с этим представляет интерес исследование синтетической активности дермальных фибробластов, выделенных из нормальной, рубцовой и эмбриональной кожи человека. Можно предполагать, что эти клетки будут иметь различные морфологические и синтетические особенности. В проведенном исследовании изучали изменения состава внеклеточного матрикса, синтезированного различными дермальными фибробластами, заключенными в коллагеновый или фибриновый гель, в процессе их культивирования. Были проанализированы коллагеновые и фибриновые эквиваленты на сроках культивирования от 1 до 10 сут. Контролем служили гели без введенных в них клеток. Методами электрофореза и Вестерн-блота была показана разница в составе и количестве белка, синтезируемого разными фибробластами в течение этого периода.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки в рамках Госконтракта № 2007-2-2-06-01.